

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR NEUROLOGIE
AM BEZIRKSKLINIKUM REGENSBURG
LEHRSTUHLINHABER: PROF. DR. ULRICH BOGDAHN
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**MUSKELKRÄMPFE UND NEUROPATHIEN
BEI PATIENTEN MIT ALLOGENER BLUTSTAMMZELLTRANSPLANTATION
UND GRAFT-VERSUS-HOST-ERKRANKUNG**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Peter Kraus

2014

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR NEUROLOGIE
AM BEZIRKSKLINIKUM REGENSBURG
LEHRSTUHLINHABER: PROF. DR. ULRICH BOGDAHN
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**MUSKELKRÄMPFE UND NEUROPATHIEN
BEI PATIENTEN MIT ALLOGENER BLUTSTAMMZELLTRANSPLANTATION
UND GRAFT-VERSUS-HOST-ERKRANKUNG**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Peter Kraus

2014

Dekan:

Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter:

PD Dr. Klemens Angstwurm

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Daniel Wolff

Tag der mündlichen Prüfung:

29.07.2014

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	6
1.1. Abkürzungsverzeichnis.....	6
1.2. Einleitung & Zielsetzung.....	7
1.3. Material & Methoden.....	9
1.4. Ergebnisse.....	13
1.5. Diskussion.....	19
1.6. Literaturverzeichnis.....	23
2. Publikation.....	28
3. Danksagung.....	64
4. Erklärungen.....	65

1. Zusammenfassung

1.1. Abkürzungsverzeichnis

aGVHD	akute Graft-versus-Host Erkrankung (engl. <i>acute Graft-versus-Host disease</i>)
allo-HSCT	allogene Transplantation peripherer Blutstammzellen (engl. <i>allogeneic hematopoietic stem cell transplantation</i>)
ANA	antinukleäre Antikörper
cGVHD	chronische Graft-versus-Host Erkrankung (engl. <i>chronic Graft-versus-Host disease</i>)
CIDP	chronische inflammatorische demyelinisierende Polyradikuloneuropathie
DML	distale motorische Latenz
EMG	Elektromyographie
GBS	Guillain-Barré-Syndrom
GVHD	Graft-versus-Host Erkrankung (engl. <i>Graft-versus-Host disease</i>)
HFA	engl. <i>High frequency attenuation</i>
HLA	engl. <i>human leukocyte antigen</i>
MRC	engl. <i>Medical research council</i>
MSAP	Muskelsummenaktionspotential motorischer Nerven
MUAP	Aktionspotentiale motorischer Einheiten (engl. <i>motor unit action potential</i>)
N.	Nervus
NLG	Nervenleitgeschwindigkeit
PNP	Polyneuropathie
PNS	peripheres Nervensystem
PSA	pathologische Spontanaktivität
SNAP	sensibles Nervenaktionspotential
VAS	visuelle Analogskala
ZNS	zentrales Nervensystem

1.2. Einleitung & Zielsetzung

Die GVHD ist eine häufige Komplikation der allo-HSCT und einer der Hauptgründe für Morbidität und Sterblichkeit nach dieser Prozedur [1], [2], [3].

Bei der Erkrankung handelt es sich um eine gegen Gewebe des Transplantatempfängers gerichtete Immunantwort, welche vermittelt durch allo- und autoreaktive B- und T-Lymphozyten, zu einer multisystemischen Inflammation führt. Dabei ist zwischen der aGVHD und der cGVHD zu unterscheiden. Während bisher aus epidemiologischen Gründen lediglich der Zeitpunkt der Erstmanifestation in Bezug auf die Transplantation (≤ 100 Tage bei aGVHD bzw. >100 Tage bei cGVHD) zur Differenzierung zwischen beiden Formen herangezogen worden ist, geht man mittlerweile von zwei eigenständigen Erkrankungen mit jeweils bestimmten klinischen und histopathologischen Korrelaten aus. So kann die für eine aGVHD typische Histologie auch >100 Tage nach HSCT (*late-onset*) oder parallel zu einer cGVHD (*overlap-syndrome*) auftreten. Die typischen Manifestationsorte einer aGVHD sind mit absteigender Häufigkeit die Haut, der Gastrointestinaltrakt und die Leber. Die cGVHD kann zusätzlich diverse andere Organe befallen (Auge, Mundschleimhaut, Lunge, Faszien, Genitaltrakt) und ähnlich einiger Autoimmunerkrankungen wie Sklerodermie, Sjögren-Syndrom oder Autoimmunzytopenien verlaufen. Sie entwickelt sich entweder aus einer aktiven aGVHD (*=progressive*), bei Zustand nach durchgemachter aGVHD (*=quiescent*) oder ohne vorangehende aGVHD (*=de novo*) und zeichnet sich häufig durch langwierige Verläufe aus, welche einer oft langfristigen immunsuppressiven Therapie bedürfen [1], [4], [5].

Wie Grauer et al. [6] in einem systematischen Review feststellten, sind neurologische Manifestationen einer GVHD selten, haben aber wesentlichen Einfluss auf Krankheitsverlauf und Lebensqualität der Patienten. Weitaus häufiger betroffen als das ZNS ist dabei das PNS. Als häufigste neurologische Komplikation einer GVHD wird mit einer Inzidenz von 2-3% nach allo-HSCT die Polymyositis beschrieben, gefolgt von Immunneuropathie und Myasthenia Gravis mit Inzidenzen von jeweils unter 1%.

Um eine Schädigung des PNS auf eine GVHD zurückführen zu können, ist der Ausschluss weitaus häufigerer Ursachen wie z.B. Steroidmyopathie, Arzneimitteltoxizität oder opportunistischer Infektionen obligat [12], [7].

Neuropathien bei Patienten mit GVHD stellen sich sehr unterschiedlich dar. Verläufe im Sinne eines GBS [8], [9], einer CIDP [10] oder einer chronischen immunvermittelten

axonalen PNP [11] sind bekannt, wobei die Diagnosekriterien für GBS und CIDP häufig nicht vollständig erfüllt werden [12], [13].

Muskelkrämpfe stellen sich typischerweise als plötzlich einsetzende, schmerzhafte, sicht- und tastbare, mehrere Sekunden bis Minuten anhaltende Kontraktion von einzelnen Muskeln oder Muskelgruppen dar, wobei durch Dehnung selbiger in der Regel der Krampf beendet werden kann. In der Folge bleiben häufig über 2-3 Tage muskelkaterartige Schmerzen in den betroffenen Muskeln bestehen. Muskelkrämpfe können ohne offensichtliche Ursache bei ansonsten gesunden Individuen auftreten, aber auch auf dem Boden unterschiedlichster Grunderkrankungen wie metabolischen Störungen, extrazellulärer Flüssigkeitsdepletion, Erkrankungen des 2. Motoneurons oder Neuropathien. Des Weiteren können (auto)immunologische Mechanismen zugrunde liegen wie z.B. bei Hyperexzitabilitätssyndromen [14], [15], [16].

Muskelkrämpfe stellen eine häufig auftretende, jedoch kaum beschriebene Komplikation der GVHD dar [6], [7]. In einer prospektiven Studie zur Beurteilung von körperlicher Funktionsfähigkeit und Lebensqualität nach allo-HSCT traten bei 16% der befragten Patienten täglich Muskelkrämpfe auf, wobei ausschließlich Patienten mit moderater oder schwerer cGVHD betroffen waren [17], [18]. Dabei kann bisher keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Muskelkrämpfe bei GVHD eine eigene Manifestation der cGVHD darstellen oder auf PNP, Myopathie, Arzneimitteltoxizität oder andere sekundäre Ursachen zurückzuführen sind [6].

Vor diesem Hintergrund soll die vorliegende Studie dazu dienen, peripher-neurologische Komplikationen nach allo-HSCT und speziell die in Assoziation mit einer GVHD auftretenden Muskelkrämpfe klinisch, elektrophysiologisch und laborchemisch zu charakterisieren. Des Weiteren wurde untersucht, zwischen welchem der erhobenen Parameter ein statistischer Zusammenhang mit dem Auftreten von Muskelkrämpfen besteht.

1.3. Material & Methoden

Patienten & Bestimmung klinischer Variablen

In dieser retrospektiven Single-Center-Kohortenstudie wurden zunächst alle Patienten mit Zustand nach allo-HSCT und akuter und/oder chronischer GVHD identifiziert, welche im Zeitraum von März 2008 bis August 2010 in der Neurologischen Universitätsklinik Regensburg mit Muskelkrämpfen und/oder anderen neurologischen Symptomen vorstellig geworden waren. Diagnose und Schweregradeinteilung der GVHD war dabei im Vorfeld durch den behandelnden Hämatologen gemäß der Richtlinien der National Institutes of Health erfolgt [19], [20]. Bei allen Patienten lag eine typische GVHD vor, mindestens eines der folgenden Organsysteme betreffend: Augen, Haut, Mundschleimhaut, Lunge, Verdauungstrakt.

Die Erfüllung eines oder mehrerer der folgenden Kriterien führte zum Ausschluss aus der Studie: bereits vor allo-HSCT bestehende oder stattgehabte Erkrankungen des PNS (speziell Neuropathien, GBS oder CIDP); lange bestehender (>10 Jahre) oder schlecht eingestellter Diabetes mellitus; diabetische Nephropathie; andere schwere Erkrankungen, mit potentiell Einfluss auf die klinische oder elektrophysiologische Beurteilbarkeit peripherer Nerven; Verdacht auf GVHD des ZNS; Symptome einer ZNS-Schädigung, welche nicht durch die Krankengeschichte erklärbar sind.

Alle zu erhebenden Variablen zu Klinik und Patientenhistorie, Elektrophysiologie und Labor wurden vor Beginn des Patienteneinschlusses definiert. Folgende klinische Angaben wurden standardmäßig aus den Patientenakten erhoben: Geschlecht; Alter; zeitlicher Abstand zwischen allo-HSCT und neurologischer Evaluation; Spendertyp, -geschlecht und HLA-match; Subtyp der GVHD (akut, chronisch nach akut oder *de novo* chronisch); momentane oder vergangene immunsuppressive und/oder neurotoxische Medikation; aktuelle medikamentöse und supportive Therapien; Laborparameter aus Serum und/oder Liquor; klinisch-neurologische Befunde wie z.B. Kraftgrad/Paresen der Extremitäten, Pallästhesie, Muskelatrophie und Reflexstatus. Bezüglich der Details über Grunderkrankung, Transplantation und GVHD erfolgte eine Überprüfung der Datensätze durch einen Hämato-Onkologen.

Angaben über Muskelkrämpfe wurden anamnestisch und mittels der Krankenakten erhoben. Das eventuelle Vorliegen einer PNP wurde entsprechend der nationalen Leitlinien klinisch und elektrophysiologisch evaluiert [21]. Muskelkrämpfe wurden als plötzlich einsetzende, Sekunden bis Minuten dauernde, schmerzhafte und unwillkürliche Kontraktionen einzelner

Muskeln oder Muskelgruppen definiert, welche meist durch passive Dehnung der betroffenen Muskeln gelöst werden konnten [14]. Falls dokumentiert, wurden die Muskelkrämpfe anhand anamnestischer Angaben über Dauer, Frequenz, Schmerzintensität nach VAS (0= gar kein Schmerz bis 10= stärkster vorstellbarer Schmerz), Lokalisation und funktionelle Beeinträchtigung (z.B. gestörter Nachtschlaf, Auftreten bei Körperpflege) bewertet. Das Ansprechen der Muskelkrämpfe auf therapeutische Maßnahmen wurde ebenfalls mittels Angaben aus der Anamnese evaluiert, welche im Rahmen einer einmaligen (n=11) oder einer nachfolgenden Untersuchung (n=7) in der neurologischen Abteilung erhoben wurde. Die Resultate der Laboruntersuchungen von Liquor und Serum, welche zeitnah (+/- 3 Monate) zu der Vorstellung in der Neurologie in zertifizierten Laboren stattfanden, wurden ebenfalls den Patientenakten entnommen.

Elektrophysiologische Untersuchungen

Die elektrophysiologischen Untersuchungen erfolgten stufendiagnostisch den anamnestischen und klinischen Befunden der Patienten entsprechend. Falls vorhanden, wurde auch nachfolgende und früher nach allo-HSCT durchgeführte Elektrodiagnostik im Rahmen der Studie evaluiert. Bei keinem der eingeschlossenen Patienten war bereits vor der allo-HSCT elektrophysiologische Diagnostik erfolgt.

Die Untersuchungen umfassten sowohl sensible Neurographien von N. suralis, N. ulnaris und N. medianus als auch motorische Neurographien und F-Wellen-Ableitungen von N. tibialis posterior, N. ulnaris und N. medianus. Es wurden jeweils die Nerven der rechten Körperseite untersucht. Die mittels Infrarotthermometer überprüfte Hauttemperatur lag in jedem Fall über 30°C. Die abgeleiteten Kurven wurden auf dem Aufzeichnungssystem (Multiliner, Toennies Co., Höchberg, Deutschland) gespeichert. Folgende Variablen wurden untersucht: Amplitude des SNAPs, sensible NLG, distale Latenz sensibler Nerven, Amplitude des MSAPs, motorische NLG, DML, F-Wellen-Latenz und Anzahl der A-Wellen aus motorischen Nerven. Um eine Demyelinisierung motorischer Nerven mit möglichst hoher Sensitivität zu detektieren, wurde für den N. tibialis die HFA angewendet [22], [23], [24].

Bei allen Patienten mit Muskelkrämpfen oder Hinweisen auf eine PNP wurde bei fehlenden Kontraindikationen (Thrombopenie oder andere Gerinnungsstörungen; Leukopenie) eine EMG mit konzentrischer Nadel durchgeführt [25]. Es wurden jeweils mindestens zwei betroffene Muskeln auf das Vorhandensein von PSA oder abnormer MUAPs untersucht.

Untersuchung auf antineuronale Antikörper

Die Serumproben von 16 eingeschlossenen Patienten, welche im Zeitraum von 1 Monat vor bis 4 Monate nach der neurologischen Beurteilung entnommen und im Rahmen einer anderen Studie aufbewahrt worden waren, wurden zu Verblindungszwecken mit einem Code versehen und an das Neurologische Universitätsklinikum Heidelberg geschickt. Dort wurde mittels kommerziell erhältlichen Immunfluoreszenz-Assays mit Kleinhirngewebe von Affen und Gefrierschnitten peripherer Nerven (Euroimmun, Lübeck), die Patientenseren auf folgende antineuronale Antikörper untersucht: anti-Hu, -Ri, -Yo, -Ma/Ta, -CV2/CRMP5, -GAD, -amphiphsin, -NMDA-Rezeptor, -AMPA-Rezeptor 1 und 2, -GABA_B-Rezeptor 1 und antigliale (NMO-IgG) Antikörper. Zudem wurde mit Hilfe kommerziell erhältlicher indirekter Immunfluoreszenz-Assays auf Basis rekombinanter Zellen (Euroimmun, Lübeck) auf Antikörper gegen Glutamatrezeptoren (Typ NMDA, Typ AMPA), GABA_B-Rezeptor 1, Glyzinrezeptor, CASPR2 und LGI1 untersucht. Dazu dienten mit dem jeweiligen Antigen transfizierte HEK293-Zellen und nicht transfizierte HEK293-Zellen als Kontrolle. Die Patientenseren wurden mittels 1%igem bovinem Albumin in PBS-Puffer in den Verhältnissen 1:10, 1:100 und 1:320 verdünnt und die Gewebeschnitte bzw. Zellen jeweils darin für eine Stunde inkubiert. Gebundene humane IgG-Antikörper wurden im Anschluss durch fluorescein-konjugierte, gegen menschliches IgG gerichtete Antikörper aus Ziegen (Euroimmun, Lübeck) visualisiert. Die entstandenen Fluoreszenzmuster wurden dann von zwei erfahrenen Untersuchern unabhängig voneinander bewertet.

Statistische Analysen

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten wurde mit SPSS Version 18 (IBM, München) durchgeführt. Sowohl die kontinuierlichen als auch kategorialen Variablen wurden mit deskriptiver Statistik beschrieben. Für alle Variablen wurden die relativen Häufigkeiten und für die kontinuierlichen Variablen zusätzlich Median und Spannweite (*range*) berechnet. Längsschnittuntersuchungen kategorialer Variablen (Auftreten von Muskelkrämpfen) wurden mittels McNemar-, kontinuierlicher Variablen (Elektrophysiologie) mittels Wilcoxon-Test analysiert. Statistische Korrelationen des Auftretens von Muskelkrämpfen mit anderen (para)klinischen Faktoren wurden durch den Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman ermittelt. Zum Vergleich kontinuierlicher Variablen von Patienten mit oder ohne Muskelkrämpfen wurde der Student-T-Test für unverbundene Stichproben verwendet. Alle Tests wurden zweiseitig mit einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ durchgeführt.

Ethische Stellungnahme

Die vorgelegte Studie wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Regensburg bewilligt (Referenz 10-101-0204). Da alle verwendeten Daten routinemäßig erhoben und konsequent anonym verarbeitet wurden, war keine individuelle Einverständniserklärung der eingeschlossenen Patienten notwendig. Bei der Subgruppe der Patienten, deren Seren die spezielle Antikörperdiagnostik durchlaufen haben, wurde das Untersuchungsmaterial im Rahmen einer anderen, von der Ethikkommission zugelassenen Studie (Referenz #02/220) entnommen und für weitere Analysen aufbewahrt. Die schriftlichen Einverständniserklärungen der betreffenden Patienten dazu lagen vor.

1.4. Ergebnisse

Patienteneigenschaften und hämatologische Befunde

Wir konnten 33 Patienten (28 Männer; Alter: 23-69 Jahre) mit neurologischen Komplikationen im Rahmen einer GVHD identifizieren. Sechs Patienten wurden wegen des Verdachts auf zerebrale GVHD (n=4), adhäsive Arachnoiditis mit thorakaler Myelopathie (n=1) oder bereits vor allo-HSCT nachgewiesene PNP (n=1) ausgeschlossen. Die Vorgeschichte der übrigen 27 (davon 25 Männer; Alter: 23-69, Median 52 Jahre) Patienten enthielt bei allen eine allo-HSCT, eine akute und/oder chronische GVHD und sie klagten über Muskelkrämpfe und/oder peripher-neurologische Symptome.

Die zugrundeliegenden hämatologischen Erkrankungen waren eine akute myeloische Leukämie (n=13), ein multiples Myelom (n=4), eine akute lymphatische Leukämie (n=2), ein Hodgkin-Lymphom (n=2), ein T-Zell-Lymphom (n=2), eine chronische lymphatische Leukämie (n=1), eine chronische myeloische Leukämie (n=1), ein myelodysplastisches Syndrom mit refraktärer Anämie (n=1) und ein non-Hodgkin-B-Zell-Lymphom (n=1).

Die Stammzellen für die HSCT stammten von HLA-gematchten Geschwistern (n=10), in 11 Fällen von HLA-gematchten, nicht verwandten, und in 6 Fällen von nicht verwandten, nicht HLA-gematchten Spendern. Dabei stimmten Spender- und Donorgeschlecht in 19 Fällen überein. In 6 Fällen fand eine Transplantation von weiblichem Spender zu männlichem Empfänger, in 2 Fällen umgekehrt statt.

Alle Patienten waren nach der allo-HSCT von einer GVHD betroffen, wobei diese entweder nur akut (n=6), *quiescent* (n=14) oder *de novo* (n=7) chronisch auftrat. Der maximale Schweregrad der aGVHD war Grad I bei 6, Grad II bei 9, Grad III bei 4 und Grad IV bei einem der Patienten. Von den Patienten mit cGVHD waren 4 maximal moderat und 17 maximal schwer betroffen.

Alle Patienten hatten vor allo-HSCT mindestens eine Therapie ihrer hämatologischen Grunderkrankung erhalten (Chemotherapie, n=21; autologe HSCT, n=9; i.v. monoklonale Antikörper, n=8; Radiatio, n=4; Zytokine, n=2). Bei 15 Patienten trat im Rahmen der Behandlung mindestens eine Komplikation auf, die potentiell zu einer neurologischen Beteiligung führen kann: Steroiddiabetes aktuell/früher (n=8), pathologische Wirbelkörperfrakturen (n=3), Leukenzephalopathie (n=2), Druckläsion des N.peroneus (n=2), Bandscheibenprolaps (n=2), zerebrale Ischämie (n=1), CMV Polyradikulitis (n=1), Post-Zoster-Neuralgie und faziale Parese (n=1) und chronische Niereninsuffizienz (n=1). Jeder Patient erhielt seit Diagnose der Grunderkrankung mindestens eine neurotoxische

Therapie (Cyclosporin A, n=26; Tacrolimus, n=13; Ganzkörper- oder spinale Radiatio, n=11; Voriconazol, n=10; Lenalidomid, n=4; Vincristin, n=4; Linezolid, n=3; Thalidomid, n=2; Bortezomib, n=2; Cisplatin, n=2; Methotrexat und Cytarabin intrathekal, n=1; Vinblastin, n=1).

Die neurologische Beurteilung der Patienten erfolgte im Mittel 24 (range: 2-106) Monate nach allo-HSCT. Zum Zeitpunkt der Untersuchung hatten 6 Patienten eine aktive oder sich in Remission befindliche aGVHD. Bei 18 Patienten lag eine aktive cGVHD vor. Bei 3 Patienten war die cGVHD zum Zeitpunkt der Untersuchung in Remission, wobei die Muskelkrämpfe, welche primär unter aktiver cGVHD manifest geworden waren, weiterhin vorhanden waren. Alle außer 2 Patienten erhielten eine Mono- oder Kombinationstherapie gegen die GVHD, bestehend aus topischen und/oder systemischen Corticosteroiden (n=23), Mycophenolatmofetil (n=13), Tacrolimus (n=8), Cyclosporin A (n=3), Everolimus (n=3), Methotrexat (n=2), Biologika (n=2) und extrakorporaler Photopherese (n=1).

Neurologische Untersuchungsbefunde

Bei 23 Patienten ließen sich klinische Zeichen einer PNP feststellen, überwiegend alle Extremitäten proximal oder distal betont betreffend und mit Einschränkungen sowohl von Sensibilität als auch Motorik. Der mittlere zeitliche Abstand zwischen allo-HSCT und Auftreten der PNP-Symptome betrug 6 (range 0-83) Monate. Drei Patienten berichteten, bereits vor allo-HSCT Symptome gehabt zu haben, welche mit einer milden sensiblen PNP vereinbar wären. Eine klinisch-neurologische oder elektrophysiologische Verifikation war allerdings vor der allo-HSCT in keinem Fall erfolgt. Alle 6 Patienten mit ausschließlich aGVHD hatten eine sich schnell entwickelnde PNP mit klinisch manifesten, moderaten Paresen (n=4), stark vermindertem (n=2) oder/und fehlendem (n=4) Vibrationsempfinden. Drei Patienten erfüllten die Kriterien eines primär axonalen GBS. Bei zwei Patienten mit demyelinisierender PNP (einer davon mit autonomer Beteiligung) waren die Kriterien eines GBS hingegen nicht vollständig erfüllt [26].

Insgesamt zeigte die klinische Untersuchung bei 16 von 27 Patienten Paresen ($MRC \leq 4$) [27] an den Extremitäten, bei 11 symmetrische distal betonte Muskelatrophien und bei 23 abgeschwächte oder fehlende Muskeleigenreflexe an den Beinen. 18 Patienten hatten ein gestörtes Vibrationsempfinden ($\leq 4/8$; gemessen mit Stimmgabel nach Rydel-Seiffer) an den Malleolen. Ein Patient präsentierte sich mit proximal betonten Paresen, beidseitiger Ptosis und Schwäche der Kopfbeugemuskeln. Elektrophysiologisch und serologisch konnten aber keine für eine Myasthenia gravis typischen Befunde erhoben werden [28].

Klinische Charakterisierung der Muskelkrämpfe

18 der 27 eingeschlossenen Patienten berichteten von Muskelkrämpfen, welche im Mittel 9 (range 0-59) Monate nach allo-HSCT erstmalig aufgetreten seien. Bei 14 Patienten bestanden sowohl Muskelkrämpfe als auch PNP. Nur 33,3% der Patienten mit ausschließlich aGVHD hatten Krämpfe, von denen mit cGVHD hingegen 76,2%.

Zwölf Patienten litten mindestens einmal pro Tag an Muskelkrämpfen. Neun Patienten gaben eine Dauer der Episoden von 1-10 Minuten, drei sogar von >10 Minuten an. Nach der Schmerzhaftigkeit der Krämpfe befragt (n=11), gaben die Patienten meist starke Schmerzen mit einem Mittel von 7-8 von 10 nach VAS an. Betroffen war bei allen 18 Patienten die Wadenmuskulatur und häufig (n=15) zusätzlich andere Muskelgruppen wie die Ischiokrural-, Hand-, Unterarm- oder Brustkorbmuskulatur. Das überwiegende Auftreten aus körperlicher Ruhe heraus führte ebenso wie das seltener berichtete Auftreten vor oder während Betätigung der betroffenen Muskeln bei 12 Patienten zu funktionellen Einschränkungen wie massiv gestörtem Nachtschlaf, Gang- und Atemschwierigkeiten oder Problemen bei der Körperpflege.

16 Patienten hatten bereits Medikamente gegen die Muskelkrämpfe erhalten, welche in 15 Fällen initial aus Magnesium-Präparaten bestand und zu 67% eine Besserung bewirkte. Mit 43% Ansprechrate stellte Chinin eine mögliche Zweitlinientherapie dar. Therapieversuche mit anderen Pharmaka waren hingegen meist ineffektiv (*siehe Tabelle*). Meist waren zusätzliche Dehnübungen während der Krampfepisoden aber auch zu Prophylaxe im Intervall ausreichend um Linderung zu verschaffen, schwere Fälle ausgenommen. In 4 Fällen waren die Krämpfe therapierefraktär. Das Ansprechen der Krämpfe auf Therapie war unabhängig von Schweregrad der GVHD und immunsuppressivem Regime.

Tabelle: Medikamentöse Therapie der Muskelkrämpfe

Medikament (n)	Ansprechen auf Therapie	
	Ja	Nein
Medikamentöse Therapie (n=16) ^a	12	4
Magnesium (n=15)	10	5
Chinin (n=7)	3	4
Gabapentin (n=3)	1	2
Pregabalin (n=2)	1	1
Carbamazepin (n=1)	0	1

a 16 von 18 Patienten erhielten teils multiple Medikamente gegen Muskelkrämpfe

Elektrophysiologische Befunde

Zweiundzwanzig der 23 Patienten mit klinisch vermuteter PNP hatten in mindestens einem Nerven abnorme Neurographiebefunde. Der verbleibende Patient wurde nicht neurographisch untersucht, zeigte jedoch ein neuropathisches Muster in der EMG. Bei 3 Patienten waren lediglich sensible, bei 19 Patienten sowohl sensible als auch motorische Nerven affiziert. Sechs Patienten zeigten ein axonales, zwei Patienten ein demyelinisierendes (NLG des N. tibialis ≤ 30 m/s) Schädigungsmuster und 14 wiesen Zeichen einer kombinierten Schädigung auf [21]. Die elektrophysiologischen Kriterien für demyelinisierendes GBS [26] oder CIDP [29] waren nie erfüllt. Bei einigen Patienten fanden sich ein vollständiger Verlust des SNAPs von N. suralis (n=4), N. medianus (n=3) und des N. ulnaris (n=1) bzw. des MSAPs des N. tibialis (n=1) als Zeichen einer schweren PNP. Als häufigste Abnormitäten wurden verminderte SNAP Amplituden (jeweils n=16) sowie sensible NLGs (n=15 bzw. n=9) in N. medianus und N. ulnaris gefunden. Ebenfalls häufig waren verlängerte oder fehlende F-Wellen-Antworten und reduzierte motorische NLGs des N. tibialis (n=11 bzw. n=10), N. medianus (n=6 bzw. n=5) und N. Ulnaris (n=3 bzw. n=4).

Neunzehn Patienten erhielten EMGs der von Krämpfen und/oder Paresen betroffenen Muskeln. Dabei zeigten 10 Patienten neuropathische MUAPs, ein Patient ein myositistypisches (kleine MSAP und Fibrillationen) Muster und drei Patienten ein myopathisches Muster, welches bei fehlender PSA und normwertiger Serum-CK als Steroidmyopathie gedeutet wurde. Alle Patienten mit kleinen MUAPs hatten regelmäßig Muskelkrämpfe, zwei davon gleichzeitig eine PNP. Die EMG-Untersuchungen fanden alle im krampffreien Intervall statt, da kein Patient während seines Ambulanz-Besuches Muskelkrämpfe hatte. Doublets, myotonie-artige, oder komplex-repetitive Entladungen traten nie auf. Bei 9 der 10 Patienten mit neurogenem EMG konnte neurographisch eine PNP bestätigt werden, wobei 7 klinisch eine schwere, motorische PNP zeigten.

Zusammengefasst war das neurophysiologische Profil der meisten Patienten (n=20) vereinbar mit einer überwiegend axonalen PNP.

Laboruntersuchungen & Screening auf antineuronale Antikörper

Bei 5 Patienten, von denen eine Liquoruntersuchung vorlag (n=6), ergab diese auffällige Befunde mit erhöhtem (>450mg/l) Gesamtproteingehalt bei gestörter Blut-Liquor-Schranke in 4 Fällen. Oligoklonale Banden oder eine intrathekale Immunglobulin(Ig)-Synthese wurden nicht nachgewiesen. Alle 5 Patienten mit erhöhtem Liquorprotein hatten eine PNP und 3 davon zudem Muskelkrämpfe. Bei zweien wurde eine milde Pleozytose mit lymphozytärem Infiltrat ohne Erregernachweis gefunden.

Einer von 13 Patienten hatte eine Serum-CK, 14 von 23 eine Serum-LDH oberhalb der Norm. Bei 8 von 25 lag die Thrombozytenzahl außerhalb des Referenzbereichs (n=7 < 100000/μl; n=1 > 400000/μl). Alle Patienten mit multiplem Myelom und IgG-Paraprotein (n=4) hatten Muskelkrämpfe. Diese manifestierten sich nach erfolgter allo-HSCT im Verlauf der GVHD, ebenso wie die PNP bei 3 dieser Patienten.

Die Untersuchung auf antineuronale und anti-Ionenkanal-Antikörper bei 16 Patienten (davon 10 mit Muskelkrämpfen) ergab keinen spezifischen Nachweis. Der mit Nervengewebe von Affen versehene, indirekte Immunoassay zeigte jedoch bei zwei Patienten eine Serumreaktivität gegen peripheres Myelin. Einer dieser Patienten war von schweren Muskelkrämpfen sowie einer milden PNP mit Areflexie und erhöhtem Liquorprotein (1676mg/l) betroffen. Außerdem lagen ANAs gegen den Spindelapparat hochtitrig (1:3200) vor. Der andere Patient hatte keine Muskelkrämpfe, jedoch eine axonale PNP mit hochgradigen Paresen (MRC 2/5). Weitere Patientenserum zeigten Reaktivität gegen Nervengewebe in Form von antimitochondrialen Antikörpern (n=1) oder ANAs (n=2), wobei nur bei einem Patienten eine Bestätigung mittels Hep2-Zell-Assay (Titer 1:160) erfolgte.

Verlaufsuntersuchungen

Neben 10 Patienten, welche im Verlauf erneut untersucht wurden (letzte Folgeuntersuchung 1-27, Median 11 Monate nach Erstuntersuchung), wurde ein Patient mit neurophysiologischer Untersuchung nach allo-HSCT, 102 Monate vor der aktuellen Untersuchung, in die Längsschnitt-Analyse eingeschlossen. Unter verschiedenen Kombinationen symptomatischer und immunsuppressiver Therapien erfuhren 4 von 7 Patienten eine Besserung, 3 von 7 keine Änderung oder Verschlechterung der Muskelkrämpfe im Verlauf. Paresen und Sensibilitätsstörungen als klinische Symptome einer PNP (n=11) besserten sich in 3, blieben gleich in 5 und verschlechterten sich in 3 Fällen.

Im Vergleich der ersten und letzten elektrophysiologischen Messungen (Wilcoxon-Test), ergab sich für die DML des N.tibialis eine signifikante Verbesserung (n=8; Median 5,1ms vs. 4,0s; p=0,028). Mit abnehmender Tendenz blieben NLG (38m/s vs. 37,3m/s) und Amplitude (5mV vs. 3,5mV) hingegen ohne signifikante Änderung, ebenso wie die Neurographien des N.ulnaris (n=6), N.medianus (n=5) und N. suralis (n=10).

Bei allen Patienten (n=27) war eine hämatologische Nachbeobachtung über mindestens 12 Monate vorhanden. Zwölf Patienten verstarben, davon 7 aufgrund opportunistischer Infektionen bei Immunsuppression, 4 durch Exazerbation der GVHD und 1 durch Rezidiv seiner malignen Grunderkrankung.

Statistische Korrelation von Muskelkrämpfen mit anderen Variablen

Um statistische Korrelationen des Auftretens von Muskelkrämpfen mit anderen Variablen zu detektieren, wurde eine multivariate Regressionsanalyse durchgeführt. Signifikant positiv korreliert waren dabei der zeitliche Abstand zur allo-HSCT (r=0,474; p=0,012), Kraftgrad nach MRC (r=0,540; p=0,004), kleine MUAPs im EMG (r=0,478; p=0,045) sowie in der Neurographie des N.tibialis MSAP-Amplitude (r=0,501; p=0,009) und HFA (r=0,609; p=0,003). Weiblicher Donor bei männlichem Empfänger schien positiv assoziiert, jedoch nicht signifikant (r=0,378; p=0,052). Signifikant negativ korrelierten weibliches Empfängergeschlecht (r=-0,400; p=0,039), Tacrolimus jemals (r=-0,577; p=0,002), Muskelatrophien (r=-0,533; p=0,004), neurogene MUAPs im EMG (r=-0,800; p=0,000) und DML des N.tibialis (r=-0,480; p=0,018).

Gerade die Zeichen einer schweren PNP (Paresen, Muskelatrophien, kleine MSAPs, große DML, neurogene MUAPs) korrelierten also negativ mit Krämpfen. Im Vergleich zu Patienten ohne Muskelkrämpfe hatten Patienten mit Krämpfen signifikant höhere MSAP-Amplituden (7,6mV vs. 2,2mv; p=0,011) und niedrigere DMLs (4,0ms vs. 5,1ms; p=0,014) im N.tibialis. Die HFA – ein Marker für beginnende Demyelinisierung [24] – war bei den Patienten mit Muskelkrämpfen außerdem signifikant höher (32,1 vs. 18,0; p=0,02). Es ließen sich weder Korrelationen mit Liquor- oder Serumparametern, noch mit GVHD-bezogenen Parametern (Grading, Befallsmuster, chronisch/akut usw.) feststellen.

Zusammenfassend bestand bei unseren Studienpatienten eine negative Wechselbeziehung zwischen Muskelkrämpfen und axonaler PNP sowie momentaner oder zurückliegender Tacrolimus-Therapie. Ein positiver statistischer Zusammenhang bestand mit beginnender, demyelinisierender PNP und Myopathie.

1.5. Diskussion

In dieser Studie haben wir PNS-Komplikationen bei GVHD nach allo-HSCT untersucht. Die am häufigsten festgestellten Störungen waren axonale PNP und Muskelkrämpfe, deren Auftreten zueinander negativ korrelierte.

Neurologische Komplikationen nach allo-HSCT betreffen rund 2/3 der Patienten und scheinen besonders häufig in Verbindung mit cGVHD und Immunsuppression aufzutreten [30], [31]. Wir können bestätigen, dass Komplikationen des PNS eher mit größeren zeitlichen Abständen zur allo-HSCT auftreten [32]. Während aufgrund der Einschlusskriterien alle unsere Studienpatienten eine GVHD hatten, gibt es auch Berichte über Neuropathien nach allo-HSCT ohne bestehende GVHD im klassischen Sinne [8], [9], [33]. Es ist denkbar, dass das PNS, wenn auch in seltenen Fällen, den Ort der Erstmanifestation einer GVHD darstellen kann.

Das retrospektive Design unserer Studie lässt keine Aussagen über Inzidenzen zu. Dennoch kann man aufgrund der Tatsache, dass wir in einer Zeitspanne, in der in unserem Transplantationszentrum ca. 200 Langzeitüberlebende gesehen wurden, 27 Patienten mit GVHD-assoziierten PNS Symptomen rekrutieren konnten, vermuten, dass solche in diesem Rahmen häufiger vorkommen als bisher gedacht. 23 Patienten mit PNP und 18 mit Muskelkrämpfen bei nur einem Fall von Myositis und keinem mit Myasthenie legen außerdem nahe, dass PNP und Muskelkrämpfe die häufigsten PNS-Komplikationen der GVHD darstellen, wobei mangels konsequenter Fahndungsstrategien zudem von einer hohen Dunkelziffer auszugehen ist [6].

Neuropathien bei GVHD können sehr unterschiedlich, am häufigsten als GBS- sowie CIDP-artige Syndrome [6], [10] oder milde PNP [30] verlaufen. Ähnlich wie bei Padovan et al. [34], welche bisher eine der wenigen Studien mit strukturiert durchgeführter Elektrophysiologie bei Patienten nach allo-HSCT darstellt, fanden wir überwiegend axonale und unklassifizierbare PNP, meist sensorisch betont. Ein eindeutig demyelinisierendes Muster fand sich lediglich in 2 Fällen. Trotz erhöhten Liquorproteins in 5 von 6 Fällen, erfüllte keiner unserer Patienten die elektrodiagnostischen Kriterien für ein GBS oder eine CIDP. Das breite Spektrum an Neuropathien bei GVHD lässt vermuten, dass ebenso heterogene Ätiologien zugrunde liegen. Dies muss für die Interpretation einer PNP bei GVHD berücksichtigt werden [6], [21]. Keiner unserer Patienten bot Hinweise auf eine Critical-Illness-PNP, maligne Infiltration im Rahmen der Grunderkrankung oder akute Neurotoxizität durch Hochdosis-Chemotherapie. Jedoch können wir nicht ausschließen, dass ein steroid-

induzierter Diabetes mellitus oder momentane/zurückliegende, potentiell neurotoxische Therapien (z.B. Voriconazol, Cyclosporin A, Lenalidomid) zur PNP beigetragen haben. Zell- [35], [36] und antikörpervermittelte [37] Immunreaktionen, aber auch vaskulitische Nervenschäden [38] wurden bei GVHD-assoziierten Neuropathien bereits beschrieben. Bei unseren Patienten wurden keine immunologischen oder histologischen Untersuchungen durchgeführt. Der zeitlich eng mit der GVHD assoziierte Verlauf der PNP vieler unserer Patienten und die Rückläufigkeit selbiger unter Immunsuppression suggerieren jedoch, dass die PNP eine Manifestation der GVHD darstellt. In Zukunft wird weitere wissenschaftliche Anstrengung, zum einen zur Identifizierung der Schädigungsursachen, zum anderen zur Entwicklung einer strukturierten Diagnostik nötig sein, um in der Klinik zwischen diesen Ursachen differenzieren und adäquate therapeutische Konsequenzen ziehen zu können.

Muskelkrämpfe bei Patienten mit GVHD wurden bisher kaum beschrieben [6], [7], [17]. Greenspan et al. [39] berichteten von einem Patienten mit schweren Muskelkrämpfen als Spätkomplikation einer cGVHD bei sensorischer PNP und Besserung der Symptome nach Azathioprin und Kortikosteroiden. In unserer Studie waren Muskelkrämpfe häufiger bei chronischer als bei aktuer GVHD und beeinträchtigten durch ihre hohe Frequenz und Schmerzintensität bei den meisten Patienten Tagesaktivität und/oder Nachtschlaf deutlich. Meist brachten regelmäßige Dehnübungen und symptomatische Pharmaka bereits deutliche Milderung. Im Unterschied zu „idiopathischen“ Muskelkrämpfen, welche meist ausschließlich die Waden und Füße betreffen [14], traten die Muskelkrämpfe bei unseren Patienten meist zusätzlich in andere Muskelgruppen, wie der Ischiokrural-, Hand-, Unterarm- oder Brustkorbmuskulatur auf. Da alle Patienten parallel immunsuppressiv behandelt wurden, kann dies, ähnlich dem oben genannten Fallbericht [39], auf einen immunvermittelten Prozess hindeuten. Aufgrund meist massiver (immunsuppressiver) Vorbehandlung, könnten die Krämpfe auch Zeichen einer medikamenteninduzierten Nervenschädigung sein [6], [14]. Bemerkenswert hierbei ist jedoch die negative Korrelation zwischen dem Einsatz von Tacrolimus und Krämpfen in unserem Kollektiv. Dem retrospektiven Design und der kleinen Patientenzahl geschuldet, können keine verlässlichen Aussagen zur Wirksamkeit therapeutischer Interventionen getroffen werden. Dennoch geben die Ergebnisse Hinweise auf einen positiven Einfluss der Immunsuppression auf die Muskelkrämpfe, was in Zukunft durch größere, prospektive Studien untersucht werden sollte.

Der genaue Ursprung von Muskelkrämpfen im Allgemeinen ist weiterhin in Diskussion [14].

Da es uns leider nicht möglich war, ein EMG während einer Krampfepisode aufzuzeichnen, können wir die aktuell am häufigsten vertretene Hypothese einer Entstehung am peripheren Nerven nicht belegen. Jedoch konnten wir eine Korrelation zwischen Muskelkrämpfen und einer erhöhten HFA, als Zeichen einer milden Demyelinisierung, zeigen. Dies könnte gemeinsam Ausdruck einer frühen, subklinischen PNP bei GVHD sein und einer schweren axonalen Schädigung vorausgehen, eventuell einhergehend mit einer Besserung der Krämpfe. Der pathophysiologische Mechanismus dieser Beobachtung ist unbekannt, jedoch kann man, in Zusammenschau mit der Reaktivität gegen peripheres Myelin zweier Patienten-Seren, über einen immunvermittelten Mechanismus im Rahmen einer GVHD spekulieren. Spezifische Antikörper, welche im Zusammenhang mit Hyperexzitabilitätssyndromen vorbeschrieben sind, konnten bei keinem unserer Patienten nachgewiesen werden [15].

In unserem Studienkollektiv herrschte ein Männeranteil von >90% vor, wobei durch das retrospektive Studiendesign ein Selektionsbias unvermeidbar ist. Dennoch stellten bereits Suzuki et al [13] in ihrem Review von 28 Fallberichten von Patienten nach allo-HSCT einen Männeranteil von 74% bei GBS- und 89% bei CIDP-artigen Manifestationen fest. Transplantationen von Frau zu Mann gehen bekanntlich mit einer erhöhten cGVHD-Rate einher [40]. Die auf dem Y-Chromosom kodierten H-Y-Antigene könnten möglicherweise auch in peripherem Nervengewebe als Zielstruktur des Donor-Immunsystems fungieren, was eine Nervenschädigung zur Folge haben könnte.

Aus der vorliegenden Studie können diverse Folgerungen für die Betreuung von Patienten mit allo-HSCT und GVHD gezogen werden. Routinemäßig sollte vor jeder allo-HSCT eine neurologische Beurteilung erfolgen, um Komplikationen des PNS nach allo-HSCT adäquat einschätzen zu können. In der Versorgung allo-HSC-transplantierter Patienten tätige Ärzte sollten mit der Klinik von PNP vertraut sein und gezielt nach Crampi fahnden. Gegebenenfalls sollte eine fachärztlich-neurologische Untersuchung und Elektrodiagnostik erfolgen. Muskelkrämpfe bei GVHD stellen eine oft sehr schmerzhaft und beeinträchtigende Komplikation für Patienten dar. In vielen Fällen kann durch einfache körperliche Übungen und symptomatische Pharmakotherapie Linderung erreicht und dem Patienten zu mehr Lebensqualität verholfen werden. Bei therapierefraktären Muskelkrämpfen und nach Ausschluss anderer möglicher Ursachen kann, bei andernorts florider GVHD, eine Umstellung/Intensivierung des immunsuppressiven Regimes erwogen werden.

Zusammenfassend beschreibt die vorliegende Studie erstmals Muskelkrämpfe bei Patienten mit GVHD nach allo-HSCT als eigene Entität. Das Auftreten dieser Krämpfe korreliert negativ mit schwerer PNP und Tacrolimus-Therapie, wohingegen sie gehäuft im Zusammenhang mit myopathischen EMG-Veränderungen und beginnender Demyelinisierung auftreten. Um die zu Grunde liegenden Pathomechanismen identifizieren, sowie optimale Therapiestrategien von PNS-Komplikationen nach allo-HSCT entwickeln zu können, sind weitere, prospektive Studien von Nöten.

1.6. Literaturverzeichnis

1. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E (2009) Graft-versus-host disease. *Lancet* 373: 1550–1561.
2. Blazar BR, Murphy WJ, Abedi M (2012) Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nat Rev Immunol* 12: 443–458.
3. Wolff D, Gerbitz A, Ayuk F, Kiani A, Hildebrandt GC, et al. (2010) Consensus conference on clinical practice in chronic graft-versus-host disease (GVHD): first-line and topical treatment of chronic GVHD. *Biol Blood Marrow Transplant* 16: 1611–1628.
4. Shlomchik WD (2007) Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol* 7: 340–352.
5. Wolff D, Schleuning M, von Harsdorf S, Bacher U, Gerbitz A, et al. (2010) Consensus Conference on Clinical Practice in Chronic GVHD: Second-Line Treatment of Chronic Graft-versus-Host Disease.
6. Grauer O, Wolff D, Bertz H, Greinix H, Kuhl JS, et al. (2010) Neurological manifestations of chronic graft-versus-host disease after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: report from the Consensus Conference on Clinical Practice in chronic graft-versus-host disease. *Brain* 133: 2852–2865.
7. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, et al. (2005) National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 11: 945–956.
8. Wen PY, Alyea EP, Simon D, Herbst RS, Soiffer RJ, et al. (1997) Guillain-Barre syndrome following allogeneic bone marrow transplantation. *Neurology* 49: 1711–1714.

9. Thöne J, Lamprecht S, Hohaus A, Erbguth F, Bickel A (2010) Guillain-Barre syndrome as leading manifestation of graft-versus-host disease in an allogeneic bone marrow transplanted patient. *J Neurol Sci* 292: 114–116.
10. Lorenzoni PJ, Scola RH, Carsten AL, Trentin AP, Teive HA, et al. (2007) Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy in chronic graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: case report. *Arq Neuropsiquiatr* 65: 700–704.
11. Mulrooney DA, Davies SM, Walk D, Charnas LR (2003) Late occurrence of chronic immune-mediated axonal polyneuropathy following bone marrow transplant for juvenile-onset alpha-mannosidosis. *Bone Marrow Transplant* 32: 953–955.
12. Amato AA, Barohn RJ, Sahenk Z, Tutschka PJ, Mendell JR (1993) Polyneuropathy complicating bone marrow and solid organ transplantation. *Neurology* 43: 1513–1518.
13. Suzuki S, Mori T, Mihara A, Aisa Y, Ikeda Y, et al. (2007) Immune-mediated motor polyneuropathy after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 40: 289–291.
14. Miller TM, Layzer RB (2005) Muscle cramps. *Muscle Nerve* 32: 431–442.
15. Rubio-Agusti I, Perez-Miralles F, Sevilla T, Muelas N, Chumillas MJ, et al. (2011) Peripheral nerve hyperexcitability: a clinical and immunologic study of 38 patients. *Neurology* 76: 172–178.
16. Gdynia HJ, Kühnlein P, Ludolph AC, Sperfeld AD. (2006) Peripheral nerve hyperexcitability syndromes: variants, differential diagnosis and therapy, based on a clinical example. *Aktuelle Neurologie* 33(10): 560-563.
17. Herzberg PY, Heussner P, Mumm FH, Horak M, Hilgendorf I, et al. (2010) Validation of the human activity profile questionnaire in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 16: 1707–171.

18. Mumm F, Herzberg P, von Harsdorf S, Gerbitz A, Greinix H, et al. (2008) Severity of chronic GVHD correlates with comorbidities, physical functioning, and quality of life – results of an interim analysis of the German Multicenter Validation Trial. *Onkologie* 31: 46.
19. Pavletic SZ, Martin P, Lee SJ, Mitchell S, Jacobsohn D, et al. (2006) Measuring therapeutic response in chronic graft-versus-host disease: National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: IV. Response Criteria Working Group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 12: 252–266.
20. Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, et al. (1995) 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant* 15: 825–828.
21. Heuß D, Auer-Grumbach M, Haupt F, Löscher W, Neundörfer B, et al.. (2008) Diagnostik bei Polyneuropathien. In: Diener HC, Putzki N, editors. *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie*. Stuttgart: Thieme.
22. Busch V, Schulte-Mattler WJ (2010) Differentiation between uniform and non-uniform motor nerve conduction slowing. *Clin Neurophysiol* 121: 890–894.
23. Schulte-Mattler WJ, Jakob M, Zierz S (1999) Assessment of temporal dispersion in motor nerves with normal conduction velocity. *Clin Neurophysiol* 110: 740–747.
24. Schulte-Mattler WJ (2006) Conduction velocity distribution. In: Kimura J, editor. *Neurophysiology of Peripheral Nerve Diseases Handbook of Clinical Neurophysiology Series*. Amsterdam: Elsevier. 405–41.
25. Daube JR, Rubin DI (2009) Needle electromyography. *Muscle Nerve* 39(2):244-70.
26. Van der Meche FG, Van Doorn PA, Meulstee J, Jennekens FG (2001) Diagnostic and classification criteria for the Guillain-Barre syndrome. *Eur Neurol* 45: 133–139.
27. Medical Research Council: Aids to the investigation of periperal nerve injuries. London, Her majesty's stationary office. 1943.

28. Wiendl et al. Diagnostik und Therapie der Myasthenia Gravis und des Lambert-Eaton-Syndroms. In: Diener HC, Putzki N, editors. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Stuttgart: Thieme. 2012.
29. Van den Bergh PY, Hadden RD, Bouche P, Cornblath DR, Hahn A, et al. (2010) European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society guideline on management of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society - first revision. *Eur J Neurol* 17: 356–363.
30. Sostak P, Padovan CS, Yousry TA, Ledderose G, Kolb HJ, et al. (2003) Prospective evaluation of neurological complications after allogeneic bone marrow transplantation. *Neurology* 60: 842–848.
31. Padovan CS, Yousry TA, Schleuning M, Holler E, Kolb HJ, et al. (1998) Neurological and neuroradiological findings in long-term survivors of allogeneic bone marrow transplantation. *Ann Neurol* 43: 627–633.
32. Barba P, Pinana JL, Valcarcel D, Querol L, Martino R, et al. (2009) Early and late neurological complications after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 15: 1439–1446.
33. Rabinstein AA, Dispenzieri A, Micallef IN, Inwards DJ, Litzow MR, et al. (2003) Acute neuropathies after peripheral blood stem cell and bone marrow transplantation. *Muscle Nerve* 28: 733–736.
34. Padovan CS, Sostak P, Reich P, Kolb HJ, Muller-Felber W, et al. (2003) Neuromuskuläre Komplikationen nach allogener Knochenmarktransplantation. *Nervenarzt* 74: 159–166.
35. Fujisaki G, Kami M, Murashige N, Kishi Y, Hori A, et al. (2006) Guillain-Barre syndrome associated with rapid immune reconstitution following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 37: 617–619.

36. Nagashima T, Sato F, Chuma T, Mano Y, Sasaki I, et al. (2002) Chronic demyelinating polyneuropathy in graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation. *Neuropathology* 22: 1–8.
37. Bulsara KR, Baron PW, Tuttle-Newhall JE, Clavien PA, Morgenlander J (2001) Guillain-Barre syndrome in organ and bone marrow transplant patients. *Transplantation* 71: 1169–1172.
38. Gabriel CM, Goldman JM, Lucas S, Hughes RA (1999) Vasculitic neuropathy in association with chronic graft-versus-host disease. *J Neurol Sci* 168: 68–70.
39. Greenspan A, Deeg HJ, Cottler-Fox M, Sirdofski M, Spitzer TR, et al. (1990) Incapacitating peripheral neuropathy as a manifestation of chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 5: 349–352.
40. Miklos DB, Kim HT, Miller KH, Guo L, Zorn E, et al. (2005) Antibody responses to H-Y minor histocompatibility antigens correlate with chronic graft-versus-host disease and disease remission. *Blood* 105: 2973–2978.

2. Publikation

Muscle cramps and neuropathies in patients with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and graft-versus-host disease

Peter D. Kraus¹, Daniel Wolff², Oliver Grauer¹, Klemens Angstwurm¹, Sven Jarius³, Klaus P. Wandinger⁴, Ernst Holler², Wilhelm Schulte-Mattler¹ and Ingo Kleiter⁵

¹ Department of Neurology, University Medical Centre Regensburg, 93053 Regensburg, Germany

² Department of Hematology and Clinical Oncology, University Medical Centre Regensburg, 93053 Regensburg, Germany

³ Division of Molecular Neuroimmunology, Department of Neurology, University of Heidelberg, 69120 Heidelberg, Germany

⁴ Institute for Experimental Neuroimmunology, affiliated to Euroimmun, 23560 Lübeck, Germany

⁵ Department of Neurology, St. Josef-Hospital, Ruhr-University Bochum, 44791 Bochum, Germany

Current affiliation for O.G.: Department of Neurology – Division of Inflammatory Diseases of the CNS and Neurooncology, University of Münster, Münster, Germany

Corresponding author:

Ingo Kleiter, Department of Neurology, St. Josef-Hospital, Ruhr-University Bochum, Bochum, Germany; Ph.: +49-234-509-2416; Fax: +49-234-509-2411; email: ingo.kleiter@rub.de

Key words:

GVHD, HSCT, neuropathy, CIDP, muscle cramps

ABSTRACT

Objective: Graft-versus-host disease (GVHD) is an immune-mediated multisystemic disorder and the leading cause of morbidity after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Peripheral nervous system manifestations of GVHD are rare but often disabling. Whereas immune-mediated neuropathies are an established feature of GVHD, muscle cramps are not well characterized.

Methods: In a single-centre retrospective cohort we studied 27 patients (age 23 to 69 years) with GVHD (acute n=6, chronic n=21) who complained of symptoms suggestive of peripheral nervous system complications. Clinical, laboratory and neurophysiological findings were evaluated by descriptive statistics and regression analysis to detect factors associated with muscle cramps. Patient's sera were examined for anti-neuronal antibodies.

Results: Nine patients had polyneuropathy, 4 had muscle cramps, and 14 had both. Median onset of polyneuropathy and muscle cramps was 6 and 9 months after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, respectively. Neurophysiology revealed a predominantly axonal polyneuropathy in 20 of 26 patients. In 4 of 19 patients electromyography showed signs of myopathy or myositis. Muscle cramps were more frequent during chronic than acute GVHD and affected muscles other than calves in 15 of 18 patients. They typically occurred daily, lasted 1 to 10 minutes with medium to severe pain intensity, compromised daily activity or sleep in 12, and were refractory to therapy in 4 patients. Muscle cramps were less likely with tacrolimus treatment and signs of severe polyneuropathy, but more likely with myopathic changes in electromyography and with incipient demyelinating polyneuropathy, shown by increased high frequency attenuation of the tibial nerve. Serological studies revealed antinuclear or antimitochondrial antibodies in a subset of patients. Two of 16 patients had a serum reactivity against peripheral nervous tissue.

Conclusion: Muscle cramps are associated with chronic GVHD, often compromise daily activity, and correlate negatively with axonal polyneuropathy and positively with myopathy and incipient demyelination.

INTRODUCTION

Graft-versus-host disease (GVHD) is a frequent complication and the leading cause of morbidity after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) [1,2]. It is characterized by immune-mediated multisystemic inflammation. The pathogenesis of GVHD involves proliferation and activation of allo- and autoreactive T and B lymphocytes, inappropriate generation of central and peripheral tolerance and various unspecific mechanisms of chronic inflammation [3]. While acute GVHD occurs within the first months after transplantation, chronic GVHD, whether after acute or *de novo*, may last many years and requires long-term immunosuppression [4,5].

The classical targets of acute GVHD are skin, intestinal tract, and liver. Chronic GVHD may involve additional organs (eye, oral mucosa, lung, fascia, and genital tract) and mimic autoimmune diseases like myasthenia gravis or autoimmune cytopenias.

Neurological manifestations of GVHD have a major impact on the disease course and the quality of life [6]. They affect the peripheral more often than the central nervous system, starting usually several months to years after allo-HSCT. GVHD involves nerve roots, peripheral nerves, neuromuscular junction, or muscles. Polymyositis was reported as the most common neurologic complication of GVHD with an incidence of 2-3% after allo-HSCT, whereas immune neuropathies and myasthenia gravis occur in less than 1% [7,8]. The diagnosis of GVHD-associated disorders of the peripheral nervous system requires exclusion of other, more frequent causes, e.g. steroid myopathy, drug-induced toxicity, or opportunistic infections [6,9].

The clinical and electrophysiological presentation of GVHD-associated acute and chronic neuropathies is heterogeneous and resembles features of Guillain-Barré syndrome (GBS) [10,11], chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP) [12,13], or chronic immune-mediated axonal polyneuropathy [14]. Usually, the diagnostic criteria of GBS or CIDP are not met completely [15,16,17].

Muscle cramps are characterized by a rapid onset, painful visible or palpable contraction of single muscles or muscle groups, and residual soreness. They are typically relieved by stretching. Muscle cramps can occur in otherwise healthy persons (benign cramps), but they are also associated with a variety of pathological conditions, including lower motor neuron disorders, neuropathies, metabolic disorders, and immune-mediated mechanisms such as peripheral nerve hyperexcitability [18,19].

Muscle cramps are a frequent, but rarely reported, complication of chronic GVHD [6, 9]. In a prospective trial evaluating physical functioning and quality of life after allo-HSCT, the

incidence of daily muscle cramps was 16%, exclusively associated with moderate and severe chronic GVHD [20,21]. It is not known, whether muscle cramps during GVHD represent an independent, immune-mediated symptom of chronic GVHD, or are related to polyneuropathy, myopathy, toxicity of long-term immunosuppression, or other secondary causes [6].

We examined peripheral nervous system complications after allo-HSCT and characterized the clinical, electrodiagnostic and laboratory features of GVHD-associated muscle cramps. We found that muscle cramps occurred in the context of chronic GVHD and were less frequent in patients with axonal neuropathy and tacrolimus treatment.

METHODS

Patients and clinical outcome measures

In this single-centre, retrospective cohort study all consecutive patients presenting to our tertiary referral centre between March 2008 and August 2010 were included if they had a history of allo-HSCT, acute or chronic GVHD, and complained of muscle cramps or other symptoms suggestive of a nervous system disorder. GVHD was diagnosed and graded according to the criteria and guidelines of the National Institutes of Health [22,23]. All patients had typical GVHD involving at least one of the following organs: skin, eyes, oral mucosa, lungs, intestinal tract.

Exclusion criteria were: confirmed disease of the peripheral nervous system prior to allo-HSCT (particularly neuropathies, GBS, or CIDP); long-lasting (> 10 years) or uncontrolled diabetes mellitus; diabetic nephropathy; other severe diseases that potentially compromise clinical or electrodiagnostic assessment of peripheral nerves; suspected GVHD of the central nervous system; and clinical findings consistent with central nervous system lesions not explained by the patient's history.

All clinical, laboratory, and electrophysiological variables were defined prior to inclusion of patients. Standardized clinical data included: age, sex, time since allo-HSCT, origin and HLA-matching of transplant, type of GVHD (acute, chronic after acute, *de novo* chronic), immunosuppressive and neurotoxic medications, current medical and supportive therapies, laboratory data, and neurological findings, e.g. limb paresis, muscle atrophy, reflex status and vibration sense. The hemato-oncological records, including detailed data on allo-HSCT, were reviewed by a hematologist (D.W.).

Muscle cramps before and after as well as symptoms of neuropathy prior to allo-HSCT were collected according to patient's self-report and medical records. Neuropathy after allo-HSCT was evaluated by clinical examination and electrodiagnostic studies according to the national guidelines [24]. Muscle cramps were defined as sudden-onset, painful, involuntary muscle contraction that can be relieved by passive stretching of the muscle. If available, muscle cramps were graduated by: frequency, duration, pain intensity on visual analogue scale (0 = no pain to 10 = most severe pain), localisation, and functional impairment. Response of muscle cramps to treatment was evaluated by patient's history (n=11) or at follow-up examinations (n=7). Results of hematological and cerebrospinal fluid examinations (± 3 months to neurological assessment), done in certified laboratories, were retrieved from the patient files.

Electrodiagnostic studies

The electrodiagnostic tests of multiple nerves and muscles were guided by patient's complaints, symptoms and clinical findings. If available, follow-up or earlier post-allo-HSCT examinations were included. Electrodiagnostic studies before allo-HSCT had not been done in any patient.

Standard techniques and established laboratory normal values were used [25,26]. The investigations comprised sensory nerve conduction studies of sural, ulnar, and median nerves and motor nerve conduction studies as well as F-wave recordings of posterior tibial, ulnar, and median nerves. Normally, we investigated nerves of the right side. Skin temperature was monitored with an infrared thermometer and was above 30° C in every case. Nerve conduction waveforms and other relevant data were stored on the recording equipment (Multiliner, Toennies Co., Höchberg, Germany). Investigated variables were: sensory nerve action potential (SNAP) amplitude, sensory nerve conduction velocity (NCV), sensory nerve distal latency, motor nerve distal compound muscle action potential (CMAP) amplitude, motor NCV, distal motor latency (DML), F-wave latency and number of A waves from motor nerves. To detect motor nerve demyelination with high sensitivity, high frequency attenuation (HFA) of the tibial nerve was used [25,26,27].

Standard concentric needle electromyography was done in all patients with muscle cramps or signs of polyneuropathy unless in cases of thrombopenia, disturbed coagulation or leukopenia. At least two affected muscles were examined for the presence of pathologic spontaneous activity and abnormal motor unit action potentials (MUAPs).

Assessment of antineuronal antibodies

Blood samples taken between one month before to 4 months after neurological assessment, were coded for blinded investigation and tested for antineuronal antibodies at the Department of Neurology, University of Heidelberg. Using a commercial indirect immunofluorescence assay employing monkey cerebellum and unfixed peripheral nerve cryosections (Euroimmun, Lübeck, Germany) sera were analysed for anti-neuronal (anti-Hu, -Ri, -Yo, -Ma/Ta, -CV2/CRMP5, -glutamic acid decarboxylase (GAD), -amphiphysin, -N-methyl-D-aspartate receptor (NMDA-R), - α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor (AMPA-R)1 and 2, - gamma-aminobutyric acid type B1 receptor (GABA_BR1)) and anti-glial (NMO-IgG) antibodies. Additionally, commercial recombinant cell based indirect fluorescence assays (Euroimmun, Lübeck) consisting of HEK293 cells transfected with the respective antigens and of non-transfected HEK293 cells as control substrate were

used for the detection of antibodies to glutamate receptors (type NMDA, type AMPA), GABA_BR1, glycine receptor, contactin-associated protein-2 (CASPR2), and LGI1. Briefly, microscopy slides with tissue and cell substrates were incubated with the patient's serum diluted 1:10, 1:100, or 1:320 in 1% bovine serum albumin in PBS for 1 hour. Bound human IgG was visualized by a fluorescein-conjugated goat anti-human IgG antibody (Euroimmun, Lübeck). Immunostaining patterns were evaluated independently by two experienced examiners (S.J., K.P.W.).

Statistical analysis

Data were analysed using SPSS version 18 (IBM, Munich, Germany). Descriptive statistics were used to describe continuous and categorical variables. Relative frequencies were computed for all variables and additionally medians and ranges for continuous variables. Longitudinal categorical data (occurrence of muscle cramps) were analysed using the McNemar test and longitudinal continuous data (electrodiagnostic tests) using the Wilcoxon-test. Correlations between occurrence of muscle cramps and other clinical and paraclinical data were obtained using Spearman's correlation coefficient. The unpaired student's t test was used to compare continuous data of patients with or without muscle cramps. All tests were 2-sided with an alpha level of 0.05.

Ethics statement

The presented study was approved by the ethics committee of the Medical Faculty of the University of Regensburg, Germany (ref 10-101-0204). As routinely collected data were used and analysed anonymously, individual consent of the patients was not requested. In a subgroup of patients, serum samples were re-analysed which had been stored previously for another study approved by the institutional ethics review board (# 02/220). Written informed consent was obtained from these patients.

RESULTS

Patient characteristics and hematological findings

We identified 33 patients (28 men; age 23-69 years) with nervous system complications of GVHD based on clinical and electrodiagnostic assessment. Six patients were excluded because of suspected cerebral GVHD (n=4), adhesive spinal arachnoiditis with thoracic myelopathy (n=1), or confirmed polyneuropathy prior to allo-HSCT (n=1). All remaining 27 patients had a history of allo-HSCT, acute or chronic GVHD, and complained of muscle cramps or had clinical or electrodiagnostic signs of a peripheral nervous system disorder (Table 1, Table S1). Median age was 52 years (range 23 - 69), 25 patients were male. The most common underlying hematological malignancies were acute myeloid leukaemia (n=13) and multiple myeloma (n=4). Sex of donor and recipient matched in 19 and was different in 8 patients, 6 of them were male recipients with female donors. Ten transplants were derived from Human Leukocyte Antigen (HLA) matched sibling donors, 11 from matched unrelated donors, and 6 from mismatched unrelated donors. All patients had developed GVHD after allo-HSCT (acute, n=6; chronic after acute, n=14; *de novo* chronic, n=7). Severity of acute GVHD was grade I in 6, grade II in 9, grade III in 4, and grade IV in 1 patient, respectively. Maximum severity of chronic GVHD was moderate in 4 and severe in 17 patients.

Every patient had received at least one therapy for the malignant disease prior to allo-HSCT (chemotherapy, n=21; monoclonal antibodies, n=8; autologous HSCT, n=9; irradiation, n=4; cytokine therapy, n=2). Fifteen patients had one or more treatment-related comorbidities potentially involving the nervous system: present or past steroid-induced diabetes (n=8), pathological vertebral body fractures (n=3), leukoencephalopathy (n=2), pressure lesion of the peroneal nerve (n=2), vertebral disc prolaps (n=2), cerebral ischemia (n=1), CMV polyradiculitis (n=1), facial palsy and post-zoster neuralgia (n=1), and chronic renal insufficiency (n=1). Previous treatment of the hematological malignancy, opportunistic infections, or GVHD included at least one potentially neurotoxic therapy in all patients (cyclosporin, n=26; tacrolimus, n=13; spinal or total body radiation, n=11; voriconazole, n=10; lenalidomide, n=4; vincristin, n=4; linezolid, n=3; thalidomide, n=2; bortezomib, n=2; cisplatin, n=2; intrathecal methotrexate and cytarabine, n=1; vinblastine, n=1).

Neurologic assessment was done at a median of 24 months (range 2-106 months) after allo-HSCT. At the time of evaluation, 6 patients had acute GVHD or acute GVHD in remission, 18 patients had chronic GVHD, and 3 patients were in remission of chronic GVHD but continued to have muscle cramps which had started during GVHD. GVHD was treated with systemic or topical steroids (n=23), mycophenolate mofetil (n=13), tacrolimus (n=8),

cyclosporin (n=3), everolimus (n=3), or other immunosuppressants (n=5).

Neurological findings

Twenty-three patients had symptoms and clinical signs of polyneuropathy, predominantly of a diffuse pattern, involving all limbs with proximal or distal distribution and with sensory and motor deficits (Table 2, Table S2). The median time between allo-HSCT and onset of polyneuropathy was 6 months (range 0-83). Three patients reported symptoms compatible with mild sensory polyneuropathy before allo-HSCT, but neurological or electrodiagnostic examination was not available. All 6 patients with acute GVHD had rapidly evolving polyneuropathy with moderate distal symmetric paresis (n=4), loss (n=4), or severe reduction (n=2) of vibration sense, or both. Three fulfilled the clinical and electrodiagnostic criteria for axonal GBS, two patients with demyelinating polyneuropathy (one with autonomic involvement) did not fully meet the electrodiagnostic criteria for demyelinating GBS [28].

Eighteen patients reported muscle cramps starting at a median of 9 months (range 0-59) after allo-HSCT. No patient had muscle cramps before allo-HSCT. Fourteen patients had polyneuropathy plus muscle cramps. Only two of 6 patients with acute GVHD, but 16 of 21 patients with chronic GVHD had muscle cramps.

In clinical examination 16 of 27 patients had limb paresis ($MRC \leq 4$), 11 had symmetric distal muscle atrophy and 23 weak or absent deep tendon reflexes of the legs (Table 2). Vibration sense at the ankle was impaired ($\leq 4/8$) in 18 patients. One patient showed generalized, proximally pronounced limb weakness, bilateral ptosis and weakness of head flexors. Typical findings for myasthenia gravis, however, were absent in electrodiagnostic and serologic tests. No patient had focal or generalized myokymia or fasciculations.

Clinical features of muscle cramps

Muscle cramps occurred at least once per day in 12 of 18 patients and lasted more than 1 minute in 9 and more than 10 minutes in 3 patients. The pain intensity was high with a median of 7-8 of 10 on a visual analogue scale (Fig. 1, Table S2). Typically muscle cramps occurred at rest and at night, but exercise-induced muscle cramps were also reported. One patient described a “warm-up” phenomenon of painful, slowly dissolving contractions of hand and forearm muscles in the morning after waking up. Calf muscles were involved in all 18 patients. In contrast to “idiopathic” muscle cramps, further muscle groups were involved in 15 patients, e.g. hamstring, hand, forearm and thoracic muscles. Twelve patients reported functional impairment by their muscle cramps and complained of severely disturbed sleep

or difficulties to walk or breathe during and after the painful contractions of the affected muscles.

Treatment of muscle cramps

Initial therapy of muscle cramps was magnesium in 15 of 16 patients, 10 patients had a treatment response (Table 3). Further therapies included quinine in 7 patients with 3 responders, and gabapentin, pregabalin and carbamazepine, all with minor response rates. Additionally, physical activity like muscle stretching was performed by most patients, usually being sufficient to stop the muscle cramps, except in severe forms. Muscle cramps were refractory to therapy in 4 patients. There was no difference of GVHD severity or immunosuppressive therapy between patients whose muscle cramps improved or not.

Electrodiagnostic findings

Twenty-two of 23 patients with clinical signs of polyneuropathy had abnormal findings in neurophysiology of at least one of the examined nerves. The remaining patient did not undergo nerve conduction studies but had a neurogenic pattern on electromyography. In 3 patients only sensory nerves were affected, whereas in 19 patients both sensory and motor nerves were affected. Six patients showed an exclusively axonal pattern, two patients a demyelinating pattern (tibial nerve motor NCV 30 m/s or lower), and 14 patients a pattern of neuropathy with axonal and demyelinating features (Table 4). No patient fulfilled the electrodiagnostic criteria for demyelinating GBS [28] or CIDP [29]. Some patients had severe polyneuropathy with lost SNAP of sural (n=4), median (n=3), or ulnar (n=1) nerve, or lost CMAP of the tibial (n=2) nerve. Most common abnormalities were decreased SNAP amplitude and mildly decreased sensory NCV of the median and ulnar nerves. Approximately half of the patients had absent or delayed F waves from motor nerves and a decreased motor NCV of the tibial nerve.

Nineteen patients underwent electromyography of muscles affected by cramps, pareses, or both (Table 4). In 10 patients MUAPs had a neurogenic pattern, in one patient pathologic spontaneous activity and small amplitudes as signs of myositis were found, and 3 patients had a myopathic pattern with small amplitudes (assumed steroid myopathy because of lacking fibrillation potentials and normal serum creatine kinase levels). All patients with small MUAPs had frequent muscle cramps and two had a concomitant polyneuropathy. Since no patient showed muscle cramps at examination in our outpatients department, electromyography could not be done during a cramp episode. In between muscle cramps

no “myotonia-like” patterns, doublets, and repetitive or complex repetitive discharges were found in affected muscles. Seven of 10 patients with a neurogenic electromyography had moderate to severe limb paresis and muscular atrophy, all had weak or absent deep tendon reflexes. Nerve conduction studies confirmed polyneuropathy in 9 of these patients. All 4 patients without clinical and electrodiagnostic signs of polyneuropathy had muscle cramps. In summary, the electrodiagnostic profile of most patients (n=20) was consistent with predominantly axonal neuropathy.

Laboratory findings

Cerebrospinal fluid (CSF) examined in 6 patients was abnormal in 5 (2 acute, 3 chronic GVHD; Table 5). Mild pleocytosis with a lymphocytic infiltrate was found in two patients, no infectious cause was identified. Five patients had increased CSF protein of > 450 mg/l, 4 of them with compromised blood-CSF-barrier. No oligoclonal bands or intrathecal immunoglobulin (Ig) synthesis were found. All 5 patients with increased CSF protein had a polyneuropathy and 3 of them additionally muscle cramps.

Serum creatine kinase was elevated in 1 of 13 patients (median 74 U/l, range 36-1052 U/l), lactate dehydrogenase was increased in 14 of 23 patients (median 256 U/l, range 174-677 U/l), platelets were abnormal in 8 of 25 patients (<100.000/μl in 7, >400.000/μl in 1, median 194.000/μl, range 24.000-454.000/μl). Four patients with multiple myeloma had an IgG paraprotein, 3 of them had a *de novo* polyneuropathy and all had muscle cramps, both occurring after allo-HSCT in the course of GVHD.

Serological studies

Antineuronal and anti-ion-channel antibodies have been described in some patients with peripheral nerve hyperexcitability and muscle cramps [19]. Hence, a comprehensive set of antibodies was tested, but was negative in all patients (n=16, 10 with muscle cramps; Table S3). In particular, no reactivity against the voltage-gated potassium channel associated proteins leucine-rich, glioma inactivated 1 protein (LG1) and contactin-associated protein-2 (CASPR2) [30] was found. Using an indirect immunofluorescence assay with monkey central and peripheral nervous tissue, however, serum reactivity against peripheral nerve myelin was found in two patients. One had severe muscle cramps several times a day with long duration and high pain intensity as well as mild polyneuropathy with areflexia and a CSF protein of 1676 mg/l (patient #24); moreover, he had a high titer (1:3200) of serum antinuclear antibodies reactive to the mitotic spindle apparatus. The second patient (patient

#13) did not have muscle cramps, but severe axonal polyneuropathy, unable to elevate limbs against gravity. In another patient (patient #16), serum antinuclear antibodies (titer of 1:160; Hep2 cell-based assay) were positive in sections of cerebellum and plexus myentericus. Further patients also had antinuclear antibodies or antimitochondrial antibodies reactive to nervous tissue, however, confirmation assays with Hep2 cell-based assays were either negative or not done.

Follow-up examinations

Ten patients were seen again (last follow-up after 1 to 27 months, median 11 months), one other patient was added in the longitudinal analysis, who had undergone electrodiagnostic assessment after allo-HSCT and 102 months prior to the current examination. Having received a combination of various symptomatic and immunosuppressive therapies 4 of 7 patients reported an improvement and 3 reported no change or deterioration of muscle cramps. Clinically, paresis as well as sensory deficits improved in 3, were stable in 5, and worsened in 3 patients.

There was a significant improvement of distal motor latency of the tibial nerve (n=8; mean 5.1 ms versus 4.0 ms; p=0.028), whereas NCV (n=8; mean 38.0 m/s versus 37.3 m/s) and amplitude (n=10; mean 5.0 mV versus 3.5 mV) were unchanged, the latter with a trend towards deterioration (Fig. 2). No significant changes were seen in electrodiagnostic examinations of the sural (n=10), ulnar (n=6), and median (n=5) nerve.

Hematological follow-up for at least 12 months was available in all patients. Twelve patients died, 7 due to GVHD or treatment-related opportunistic infections, 4 to exacerbation of GVHD, and one to recurrence of the hematological malignancy.

Variables associated with muscle cramps

To evaluate the association between the occurrence of muscle cramps and clinical, electrodiagnostic, and laboratory variables, multiple regression analysis was done (Table 6). Muscle cramps correlated positively with the time since allo-HSCT and negatively with female sex of recipient and prior or present use of tacrolimus. Female gender of donor in male recipients and the presence of chronic GVHD seemed to be associated with muscle cramps, statistical significance, however, was not reached. Many signs of axonal neuropathy correlated negatively with the occurrence of muscle cramps (clinical: low muscle strength, presence of muscle atrophy; electrophysiological: high DML, low distal CMAP amplitude, neurogenic MUAPs on electromyography). Patients with muscle cramps had significantly

higher distal CMAP amplitudes (7.6 mV versus 2.2 mV; $p=0.011$), lower distal motor latency (4.0 ms versus 5.1 ms; $p=0.014$), and higher conduction velocity (39.1 m/s versus 35.7 m/s; $p=0.076$) in the tibial nerve (Fig. 3A-C). Small MUAPs correlated with the presence of muscle cramps, but only 1 patient showed electromyographic signs of myositis. Furthermore, high frequency attenuation (HFA), a marker of incipient myelin damage [25,27], was significantly correlated with the occurrence of muscle cramps; patients with muscle cramps had a significantly higher HFA than patients without muscle cramps (32.1 versus 18.0; $p=0.002$, Fig. 3D). Neither CSF and other laboratory variables nor severity of GVHD or localized sclerosis, an antibody-mediated manifestation of chronic GVHD, correlated with the occurrence of muscle cramps. Prior or present use of tacrolimus significantly correlated with the absence of muscle cramps.

Hence, we conclude that muscle cramps in GVHD patients are less frequent in patients with axonal neuropathy and tacrolimus treatment. On the other hand, they seem to be associated with incipient demyelinating polyneuropathy and myopathy, even in the absence of myositis.

DISCUSSION

In this study, we evaluated peripheral nervous system disorders associated with GVHD after allo-HSCT. Axonal neuropathy and muscle cramps were the major complaints; their occurrence was negatively correlated to each other.

Affecting as many as 64% of long-term survivors, neurological complications are common after allo-HSCT [31]. They are associated with long-term immunosuppression and GVHD. We confirm that disorders of the peripheral nervous system have a delayed onset and usually occur in the setting of chronic GVHD [7,16,17,32]. Whereas all patients with peripheral nervous system complications in our study per inclusion criteria had acute or chronic GVHD, others have reported the occurrence of GBS, CIDP, brachial plexopathy, or multiple radiculopathies after allo-HSCT in the absence of preceding classical GVHD [10,11,33]. Albeit uncommon, it is conceivable that GVHD may manifest first in the peripheral nervous system.

We have identified 27 patients who presented with peripheral nervous system complications (neuropathies, muscle cramps, or myopathy) during GVHD after allo-HSCT. Although our study was not designed to identify the incidence of these complications, GVHD-associated neuropathies seem to be more frequent than reported previously (1%) [7,8]. Of ~200 long term survivors treated at our transplant centre for GVHD within the observation period, 23 had polyneuropathy and 18 muscle cramps. These numbers are likely to be underestimated, since no vigorous search strategy was applied. As only one patient had myositis and no patient had myasthenia gravis, our data suggest that neuropathies and muscle cramps are more frequent during GVHD than other peripheral nervous system complications. Few previous studies used electrodiagnostic tests to identify patients with peripheral nervous system complications. Padovan *et al.* reported that 12 of 58 (21%) patients developed a *de novo* polyneuropathy after allo-HSCT and 14 (24%) distal muscular atrophy, associated with preceding severe acute GVHD, metabolic disturbances and prolonged immunosuppression [34]. In our study only two patients had a demyelinating pattern of neuropathy. The majority had an axonal or unclassified pattern, affecting sensory nerves more often than motor nerves. Although 5 of 6 patients had protein elevation in the CSF, none fulfilled the electrodiagnostic criteria for demyelinating GBS or CIDP.

Little is known about the etiology of GVHD-associated neuropathies. Often, they manifest

as GBS- or CIDP-like disease (reviewed in [6,7]), or as mild progressive neuropathy [16,34]. The close temporal relationship with the occurrence of GVHD and improvement upon immunosuppression in some patients suggest that neuropathies indeed are part of GVHD. As such, similar to idiopathic immune-mediated neuropathies, the generation of clonally expanded T cells [35,36] or of a humoral immune response against peripheral nervous tissue [37] could be causative. In our patients, no immunological studies or histology were done. Others have reported vasculitic changes [38], an infiltration of T cells and deposits of immunoglobulins [35], or a loss of myelinated fibres with perineural fibrosis [39] in sural nerve biopsies. When evaluating neuropathies in patients with GVHD after allo-HSCT, multiple causes related to the therapy or the hematological disorder have to be considered [6,7,8]. None of our patients had obvious critical-illness neuropathy or acute neurotoxicity due to high-dose chemotherapy and all patients were in remission of their hematological disease. However, we cannot exclude that steroid-induced diabetes and prior or present use of neurotoxic drugs, e.g. cyclosporin, voriconazol, or lenalidomid contributed to the neuropathies. The heterogenous presentation of GVHD-associated neuropathies might be due to different etiologies involving immune-dependent and -independent causes and reflect the fact that no common diagnostic criteria have been specified so far.

Muscle cramps have been reported only very occasionally after allo-HSCT [21]. Greenspan *et al.* [40] described a patient with severe muscle cramps as late complication of chronic GVHD, associated with primary sensory polyneuropathy; they observed an improvement after immunosuppressive treatment with steroids and azathioprine. In our study muscle cramps were more frequent during chronic than acute GVHD, had a high frequency and pain intensity, and compromised daily activity or sleep in most patients. The majority of muscle cramps improved upon physical measures (stretching) and symptomatic pharmacological treatment. All patients additionally received immunosuppression for GVHD. Owing to the retrospective design of the study, no formal claims regarding the efficacy of treatment can be made. Nevertheless, the clinical course with improving neuropathy and muscle cramps during immunosuppressive treatment in some patients described here and elsewhere [40] indicates an immunological mediated etiology. Given the wide array of immunosuppressive drugs used for GVHD, drug-induced peripheral nerve toxicity is a possible contributing mechanism, although tacrolimus was inversely associated with muscle cramps. Since all but one patient had received cyclosporin, no conclusion can be drawn whether this is a tacrolimus specific effect or generally caused by calcineurin inhibitors. All these results might

be biased by the relatively small numbers of patients and should be corroborated by larger prospective studies.

The anatomic site of muscle cramp generation still is a matter of debate, ranging from abnormal discharges of anterior horn cells, ephaptic transmission in the injured peripheral nerve, to aberrant excitation of motor nerve terminals [18,41]. Unfortunately, we did not manage to record electromyography during a cramp episode. Thus, we cannot formally prove the peripheral nervous origin of the muscle cramps in our patients. We found, however, a significant correlation between the occurrence of muscle cramps and subtle demyelination, shown by increased HFA. Our observation raises the possibility that muscle cramps and subclinical demyelinating damage are early signs of neuropathy and precede severe axonal damage in GVHD-associated neuropathies. With more pronounced axonal neuropathy, muscle cramps may even improve. The pathophysiological basis of this observation is unknown, but it might be speculated that a humoral or cellular immune response to peripheral myelin in the context of chronic GVHD is causative. We could exclude the presence of voltage-gated potassium channel antibodies which previously were associated with peripheral nerve hyperexcitability [19,30], but found a hitherto unspecified serum reactivity against peripheral myelin in two of the patients.

Our study population had a remarkable male preponderance of >90%. The retrospective design makes selection bias possible. In a report of 28 post-allo-HSCT patients, however, 74% with a GBS-like manifestation and 89% with CIDP were male [17]. Female donor to male recipient allo-HSCTs are associated with a higher rate of chronic GVHD, since the donor immune system may target host H-Y antigens by H-Y-reactive T cells and antibodies [42]. Therefore, H-Y antigens serving as *de novo* antigens for female donors may be targeted within neuronal structures leading to damage of the peripheral nervous system.

This study has several implications for the management of GVHD patients. First, baseline examinations before allo-HSCT seem useful for assessment of subsequent complications of the peripheral nervous system and should be established in clinical routine. Second, physicians in care of patients with allo-HSCT should recognize signs and symptoms of neuropathy and peripheral nerve hyperexcitability and refer patients for neurological examination and electrodiagnostic testing. Third, muscle cramps often have a high frequency and intensity resulting in functional impairment. Therefore, prompt physical and

symptomatic therapy is warranted. After exclusion of other causes of muscle cramps, immunosuppressive therapy may be changed or increased, at least in patients with further systemic signs of active chronic GVHD.

In summary, we describe muscle cramps affecting patients with GVHD after allo-HSCT as a new and clinically relevant entity. We showed that muscle cramps occur less frequently in patients with severe polyneuropathy or tacrolimus treatment; they are more likely with myopathic changes in electromyography and incipient demyelination. Further prospective studies are warranted to characterize the immunopathogenesis and best treatment of peripheral nervous system disorders after allo-HSCT .

ACKNOWLEDGEMENTS

The technical help of B. Grigo was highly appreciated.

REFERENCES

1. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E (2009) Graft-versus-host disease. *Lancet* 373: 1550-1561.
2. Shlomchik WD (2007) Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol* 7: 340-352.
3. Blazar BR, Murphy WJ, Abedi M (2012) Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nat Rev Immunol* 12: 443-458.
4. Wolff D, Gerbitz A, Ayuk F, Kiani A, Hildebrandt GC, et al. (2010) Consensus conference on clinical practice in chronic graft-versus-host disease (GVHD): first-line and topical treatment of chronic GVHD. *Biol Blood Marrow Transplant* 16: 1611-1628.
5. Wolff D, Schleuning M, von Harsdorf S, Bacher U, Gerbitz A, et al. (2010) Consensus Conference on Clinical Practice in Chronic GVHD: Second-Line Treatment of Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 17: 1-17.
6. Grauer O, Wolff D, Bertz H, Greinix H, Kuhl JS, et al. (2010) Neurological manifestations of chronic graft-versus-host disease after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: report from the Consensus Conference on Clinical Practice in chronic graft-versus-host disease. *Brain* 133: 2852-2865.
7. Openshaw H (2009) Neurological Manifestations of Chronic Graft versus Host Disease. In: Vogelsang GB, Pavletic SZ, editors. *Chronic Graft versus Host Disease*. New York: Cambridge University Press pp. 243-251.
8. Openshaw H (1997) Peripheral neuropathy after bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 3: 202-209.
9. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, et al. (2005) National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 11: 945-956.

10. Wen PY, Alyea EP, Simon D, Herbst RS, Soiffer RJ, et al. (1997) Guillain-Barre syndrome following allogeneic bone marrow transplantation. *Neurology* 49: 1711-1714.
11. Thöne J, Lamprecht S, Hohaus A, Erbguth F, Bickel A (2010) Guillain-Barre syndrome as leading manifestation of graft-versus-host disease in an allogeneic bone marrow transplanted patient. *J Neurol Sci* 292: 114-116.
12. Lorenzoni PJ, Scola RH, Carsten AL, Trentin AP, Teive HA, et al. (2007) Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy in chronic graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: case report. *Arq Neuropsiquiatr* 65: 700-704.
13. Wada S, Kimura T, Ikegame K, Kajiyama K, Takeda M, et al. (2008) [Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy and hyponatremia in a patient with chronic graft versus host disease]. *Rinsho Shinkeigaku* 48: 426-429.
14. Mulrooney DA, Davies SM, Walk D, Charnas LR (2003) Late occurrence of chronic immune-mediated axonal polyneuropathy following bone marrow transplant for juvenile-onset alpha-mannosidosis. *Bone Marrow Transplant* 32: 953-955.
15. Amato AA, Barohn RJ, Sahenk Z, Tutschka PJ, Mendell JR (1993) Polyneuropathy complicating bone marrow and solid organ transplantation. *Neurology* 43: 1513-1518.
16. Sostak P, Padovan CS, Yousry TA, Ledderose G, Kolb HJ, et al. (2003) Prospective evaluation of neurological complications after allogeneic bone marrow transplantation. *Neurology* 60: 842-848.
17. Suzuki S, Mori T, Mihara A, Aisa Y, Ikeda Y, et al. (2007) Immune-mediated motor polyneuropathy after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 40: 289-291.
18. Miller TM, Layzer RB (2005) Muscle cramps. *Muscle Nerve* 32: 431-442.
19. Rubio-Agusti I, Perez-Miralles F, Sevilla T, Muelas N, Chumillas MJ, et al. (2011)

Peripheral nerve hyperexcitability: a clinical and immunologic study of 38 patients. *Neurology* 76: 172-178.

20. Herzberg PY, Heussner P, Mumm FH, Horak M, Hilgendorf I, et al. (2010) Validation of the human activity profile questionnaire in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 16: 1707-1717.

21. Mumm F, Herzberg P, von Harsdorf S, Gerbitz A, Greinix H, et al. (2008) Severity of chronic GVHD correlates with comorbidities, physical functioning, and quality of life – results of an interim analysis of the German Multicenter Validation Trial. *Onkologie* 31: 46.

22. Pavletic SZ, Martin P, Lee SJ, Mitchell S, Jacobsohn D, et al. (2006) Measuring therapeutic response in chronic graft-versus-host disease: National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: IV. Response Criteria Working Group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 12: 252-266.

23. Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, et al. (1995) 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant* 15: 825-828.

24. Heuß D, Auer-Grumbach M, Haupt F, Löscher W, Neundörfer B, et al. (2008) Diagnostik bei Polyneuropathien. In: Diener HC, Putzki N, editors. *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie*. Stuttgart: Thieme.

25. Busch V, Schulte-Mattler WJ (2010) Differentiation between uniform and non-uniform motor nerve conduction slowing. *Clin Neurophysiol* 121: 890-894.

26. Schulte-Mattler WJ, Jakob M, Zierz S (1999) Assessment of temporal dispersion in motor nerves with normal conduction velocity. *Clin Neurophysiol* 110: 740-747.

27. Schulte-Mattler WJ (2006) Conduction velocity distribution. In: Kimura J, editor. *Neurophysiology of Peripheral Nerve Diseases Handbook of Clinical Neurophysiology Series*. Amsterdam: Elsevier. pp. 405–419.

28. Van der Meche FG, Van Doorn PA, Meulstee J, Jennekens FG (2001) Diagnostic and classification criteria for the Guillain-Barre syndrome. *Eur Neurol* 45: 133-139.
29. Van den Bergh PY, Hadden RD, Bouche P, Cornblath DR, Hahn A, et al. (2010) European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society guideline on management of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society - first revision. *Eur J Neurol* 17: 356-363.
30. Irani SR, Alexander S, Waters P, Kleopa KA, Pettingill P, et al. (2010) Antibodies to Kv1 potassium channel-complex proteins leucine-rich, glioma inactivated 1 protein and contactin-associated protein-2 in limbic encephalitis, Morvan's syndrome and acquired neuromyotonia. *Brain* 133: 2734-2748.
31. Padovan CS, Yousry TA, Schleuning M, Holler E, Kolb HJ, et al. (1998) Neurological and neuroradiological findings in long-term survivors of allogeneic bone marrow transplantation. *Ann Neurol* 43: 627-633.
32. Barba P, Pinana JL, Valcarcel D, Querol L, Martino R, et al. (2009) Early and late neurological complications after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 15: 1439-1446.
33. Rabinstein AA, Dispenzieri A, Micallef IN, Inwards DJ, Litzow MR, et al. (2003) Acute neuropathies after peripheral blood stem cell and bone marrow transplantation. *Muscle Nerve* 28: 733-736.
34. Padovan CS, Sostak P, Reich P, Kolb HJ, Muller-Felber W, et al. (2003) Neuromuskuläre Komplikationen nach allogener Knochenmarktransplantation. *Nervenarzt* 74: 159-166.
35. Fujisaki G, Kami M, Murashige N, Kishi Y, Hori A, et al. (2006) Guillain-Barre syndrome associated with rapid immune reconstitution following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 37: 617-619.
36. Eliashiv S, Brenner T, Abramsky O, Shahin R, Agai E, et al. (1991) Acute inflammatory

demyelinating polyneuropathy following bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant 8: 315-317.

37. Bulsara KR, Baron PW, Tuttle-Newhall JE, Clavien PA, Morgenlander J (2001) Guillain-Barre syndrome in organ and bone marrow transplant patients. Transplantation 71: 1169-1172.

38. Gabriel CM, Goldman JM, Lucas S, Hughes RA (1999) Vasculitic neuropathy in association with chronic graft-versus-host disease. J Neurol Sci 168: 68-70.

39. Nagashima T, Sato F, Chuma T, Mano Y, Sasaki I, et al. (2002) Chronic demyelinating polyneuropathy in graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation. Neuropathology 22: 1-8.

40. Greenspan A, Deeg HJ, Cottler-Fox M, Sirdofski M, Spitzer TR, et al. (1990) Incapacitating peripheral neuropathy as a manifestation of chronic graft-versus-host disease. Bone Marrow Transplant 5: 349-352.

41. Layzer RB (1994) The origin of muscle fasciculations and cramps. Muscle Nerve 17: 1243-1249.

42. Miklos DB, Kim HT, Miller KH, Guo L, Zorn E, et al. (2005) Antibody responses to H-Y minor histocompatibility antigens correlate with chronic graft-versus-host disease and disease remission. Blood 105: 2973-2978.

43. Reiber H (1994) Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF) - a concept common to normal blood-CSF barrier function and to dysfunction in neurological diseases. J Neurol Sci 122: 189-203.

TABLES

Table 1: Patients

Characteristic	Number
Total patients	27
Sex, male	25 (93%)
Median age	52 (23-69) years
Hematologic disease	
- AML	13 (48%)
- Multiple myeloma	4 (15%)
- ALL	2 (7%)
- Hodgkin lymphoma	2 (7%)
- T cell lymphoma	2 (7%)
- CLL	1 (4%)
- CML	1 (4%)
- MDS with refractory anaemia	1 (4%)
- Non-Hodgkin-lymphoma	1 (4%)
Median duration since allo-HSCT	24 (2-106) months
Donor type	
- matched sibling	10 (37%)
- matched unrelated donor	11 (41%)
- mismatched unrelated donor	6 (22%)
GVHD type	
- Acute	6 (22%)

- Chronic quiescent onset	14 (52%)
- Chronic <i>de novo</i> onset	7 (26%)

ALL = acute lymphoblastic leukaemia, allo-HSCT = allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, AML = acute myeloid leukaemia, CLL = chronic lymphoblastic leukaemia, CML = chronic myeloid leukaemia, GVHD = graft-versus-host disease, HLA = human leukocyte antigen, MDS = myelodysplastic syndrome.

Table 2: Clinical findings

Variable	Present	Median (range)
Muscle cramps		
- before allo-HSCT (n=26)	0	
- after allo-HSCT (n=27)	18 (67%)***	
Clinical polyneuropathy (n=27)	23 (85%)	
Muscle cramps and polyneuropathy (n=27)	14 (52%)	
Limb paresis, MRC \leq 4 (n=27)	16 (59%)	4 (2-5)
Muscle atrophy (n=27)	11 (41%)	
Reflexes weak or absent (n=27)		
- upper extremities	11 (41%)	
- lower extremities	23 (85%)	
Vibration sense LE impaired, \leq 4/8 (n=26)	18 (67%)	3 (0-8)

McNemar test (after vs. before allo-HSCT): ***p<0.001.

Table 3: Pharmacological treatment of muscle cramps

Drug (n)	Response to treatment	
	Yes	No
Any treatment (n=16) ^a	12	4
Magnesium (n=15)	10	5
Quinine (n=7)	3	4
Gabapentin (n=3)	1	2
Pregabalin (n=2)	1	1
Carbamazepine (n=1)	0	1

^a total 18 patients; multiple treatments per patient possible

Table 4: Electrodiagnostic studies

Variable	Abnormal	Median (range)
<i>Neurophysiology (n=26)</i>		
Sural nerve		
- SNAP amplitude, μ V (n=26)	4 (15%)	3.4 (0-16.5)
- NCV, m/s (n=22)	7 (32%)	43.0 (24.7-54.6)
Tibial nerve		
- DML, ms (n=24)	5 (21%)	4.1 (2.1-6.4)
- distal CMAP amplitude, mV (n=26)	7 (27%)	4.6 (0-19.1)
- NCV, m/s (n=23)	10 (43%)	39.3 (29.0-44.4)
- HFA, % (n=22)	2 (9%)	28.0 (7.0-50.0)
- F-wave latency, ms (n=26)	11 (42%)	57.4 (52.2-67.0)

- A waves, ≥ 3 (n=24)	6 (25%)	
Median nerve		
- SNAP amplitude, μV (n=20)	16 (80%)	3.4 (0-21.8)
- sensory NCV, m/s (n=17)	15 (88%)	41.0 (36.0-46.4)
- DML, ms (n=17)	2 (12%)	3.6 (2.8-4.9)
- distal CMAP amplitude, mV (n=17)	1 (6%)	6.6 (2.3-17.0)
- motor NCV, m/s (n=17)	5 (29%)	50.8 (46.5-61.7)
- F wave latency, ms (n=13)	6 (46%)	31.4 (28.8-33.8)
- A waves, ≥ 3 (n=12)	2 (17%)	
Ulnar nerve		
- SNAP amplitude, μV (n=20)	16 (80%)	2.9 (0-7.9)
- sensory NCV, m/s (n=19)	9 (47%)	43.0 (32.1-52.8)
- DML, ms (n=12)	1 (8%)	3.0 (1.9-3.5)
- distal CMAP amplitude, mV (n=12)	1 (8%)	8.9 (1.0-14.8)
- motor NCV, m/s (n=12)	4 (33%)	51.4 (43.6-56.3)
- F wave latency, ms (n=7)	3 (43%)	31.0 (28.6-33.6)
<i>Electromyography (n=19)</i>		
Muscles affected by cramps or paresis or atrophy		
- neurogenic MUAPs	10 (53%)	
- small MUAPs	4 (21%)	
- fibrillation potentials	3 (16%)	
- no pathology	5 (26%)	

CMAP = compound muscle action potential, DML = distal motor latency, HFA = high frequency attenuation, MUAP = motor unit action potential, NCV = nerve conduction velocity, SNAP = sensory nerve action potential.

Table 5: Cerebrospinal fluid findings

Variable	Present	Median (range)
Cerebrospinal fluid (n=6)		
- increased leukocyte count, > 5/ μ l	2 (33%)	2 (1-46)
- increased protein, > 450 mg/l	5 (83%)	701 (430-1850)
- increased lactate, > 2.1 mmol/l (n=5)	3 (60%)	2.3 (1.7-4.3)
- intrathecal IgG synthesis ^a (n=5)	0	
- compromised blood-CSF-barrier ^a (n=5)	4 (80%)	

^a assessed by calculation of the CSF/serum quotient [43]

CSF = cerebrospinal fluid, IgG = immunoglobulin G.

Table 6: Multiple regression analysis to detect variables associated with muscle cramps

Variable	r	p value
Medical history		
- Time since allo-HSCT	0.474	0.012
- HLA-matching	0.057	0.776
- Female sex of donor ^a	0.378	0.052
- Female sex of recipient	-0.400	0.039
- Acute GVHD	-0.239	0.230
- Chronic GVHD	0.378	0.052
- Cyclosporin ever	0.277	0.161
- Tacrolimus ever	-0.577	0.002

Clinical findings		
- Clinical PNP	-0.295	0.135
- Muscle strength, MRC	0.540	0.004
- Muscle atrophy	-0.533	0.004
- weak or absent reflexes LE	-0.295	0.135
- Vibration sense	0.149	0.459
Neurophysiology (tibial nerve)		
- DML	-0.480	0.018
- Distal CMAP amplitude	0.501	0.009
- NCV	0.356	0.095
- HFA	0.609	0.003
- F-wave latency	-0.360	0.143
Electromyography		
- fibrillation potentials	0.100	0,693
- neurogenic MUAPs	-0.800	0.000
- small MUAPs	0.478	0.045

^a male recipients only

Shown is the Spearman correlation coefficient. Dependent variable: presence of muscle cramps. Bold values depict statistically significant correlations. CMAP = compound muscle action potential, DML = distal motor latency, HFA = high frequency attenuation, LE = lower extremity, MRC = Medical research council, MUAP = motor unit action potential, NCV = nerve conduction velocity, SNAP = sensory nerve action potential.

FIGURES

Figure 1. Characteristics of muscle cramps in patients with GVHD after allo-HSCT (n=18).

NA = not available; VAS = visual analogue scale.

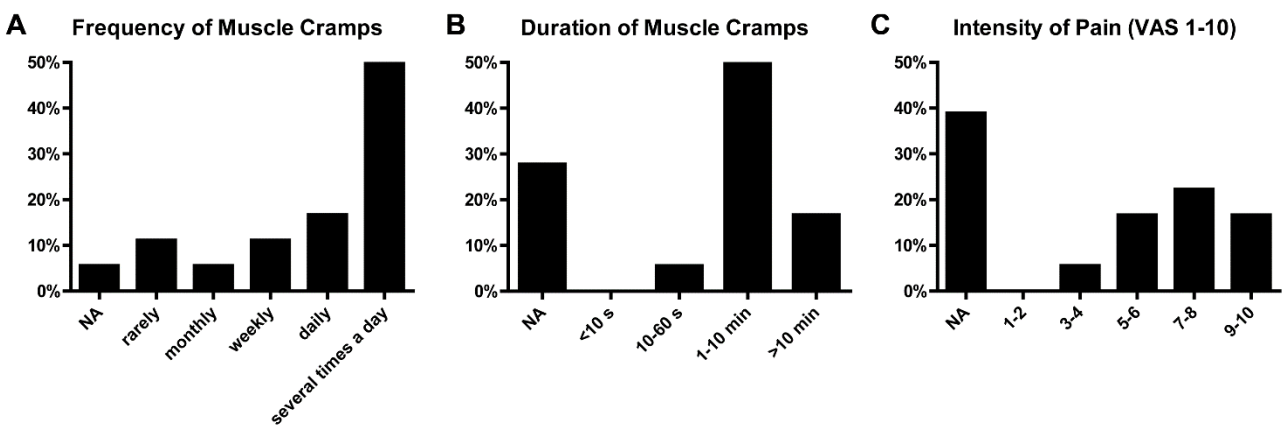


Figure 2. Longitudinal follow-up of neurography of the tibial nerve. The dotted line depicts the normal value. Results of a Wilcoxon test (first versus last examination) are shown.

DML = distal motor latency, NCV = nerve conduction velocity.

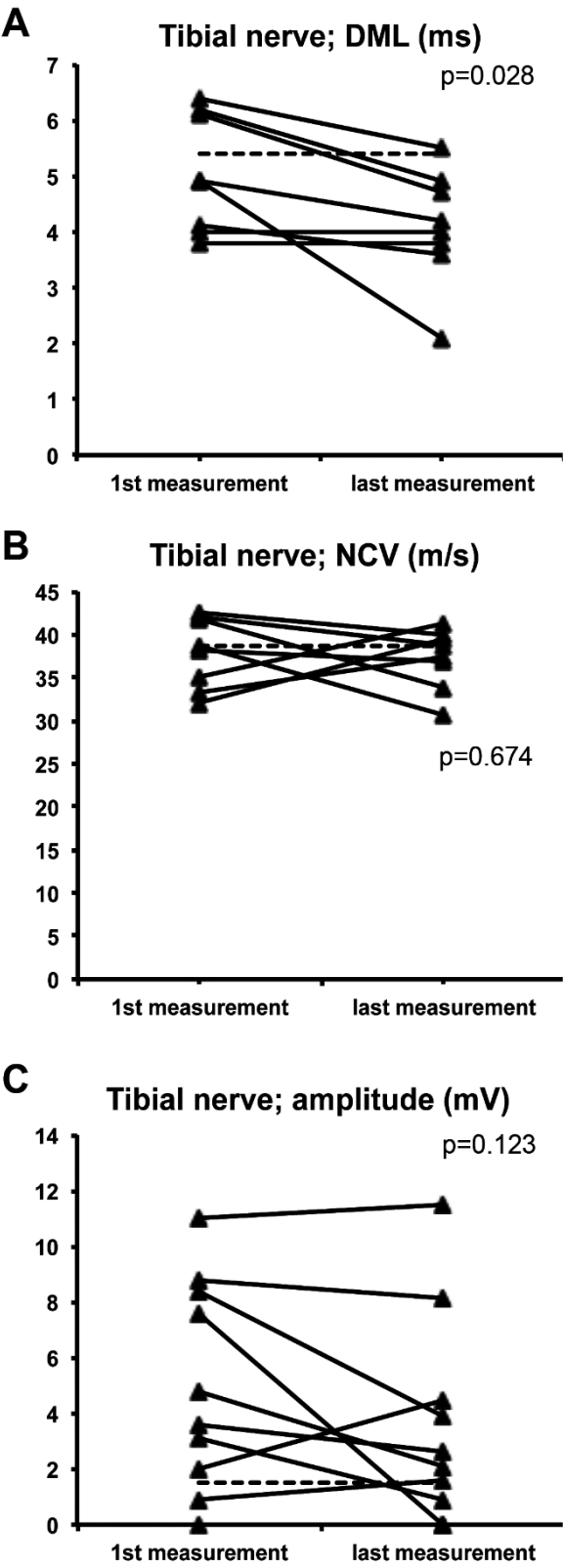
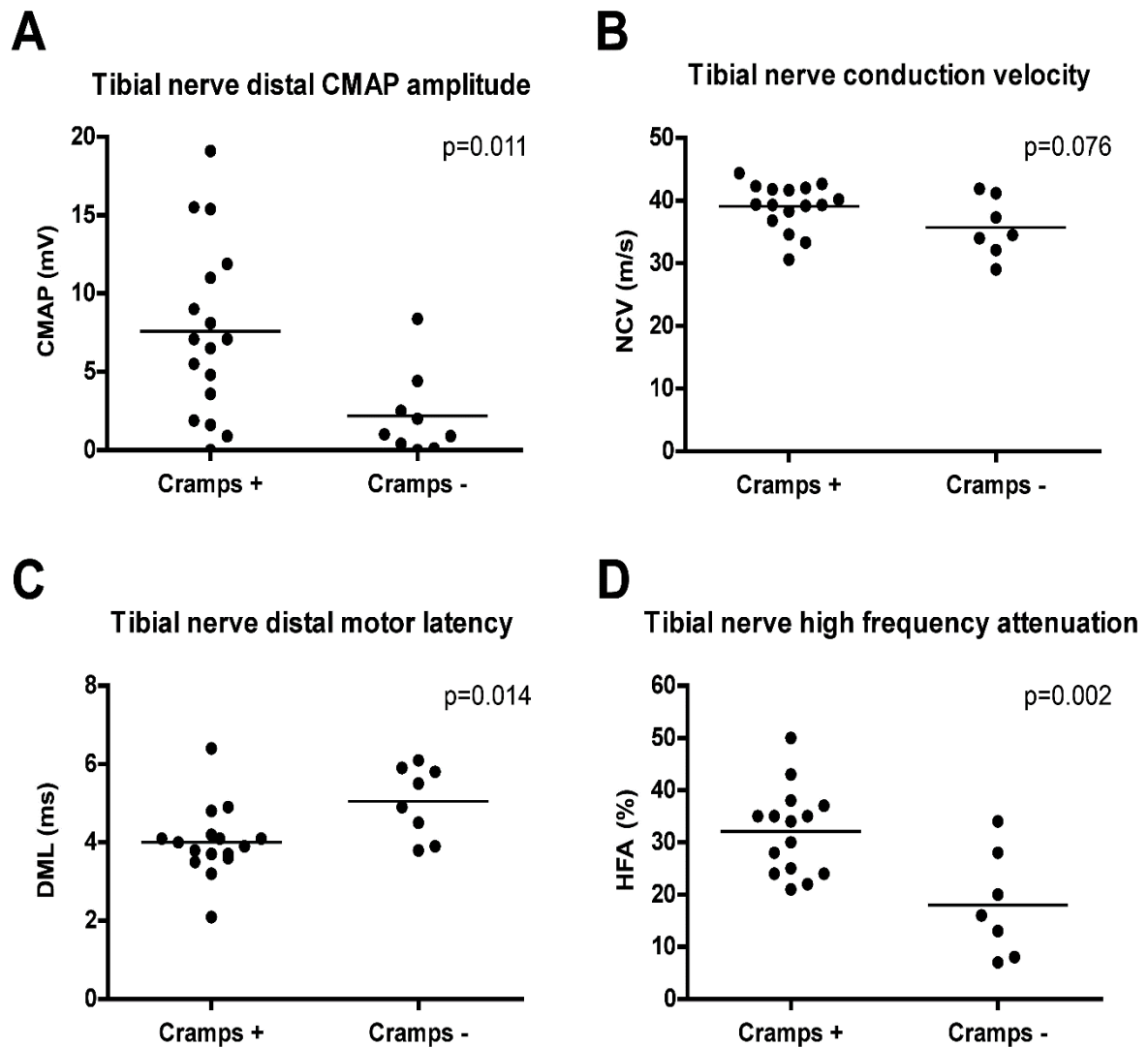


Figure 3. Neurophysiological assessment of polyneuropathy in patients with or without muscle cramps (Cramps+/Cramps-). Results of an unpaired, two-tailed *t* Test are shown. CMAP = compound muscle action potential, DML = distal motor latency, HFA = high frequency attenuation, NCV = nerve conduction velocity.



SUPPORTING INFORMATION

Table S1: Hematology

Pat. #	Sex	Age (yrs)	Underlying Malignancy	HLA-Match	Sex of Donor	Related Donor	Number of allo-HSCTs	Organ Involvement and Overall Grade	Day Onset aGVHD ^a	cGVHD Organ Involvement and Maximum Degree	Day Onset cGVHD ^a	Maximum Severity of cGVHD	Localized Sclerosis (Skin, Lung)	Immunosuppressive Treatment for cGVHD	TAC ever	CsA ever	Day Neurological Evaluation ^a	Current Severity of GVHD ^b	Current Immunosuppression ^b
1	m	52	CLL	N	m	N	1	Skin, GIT (IV ^c)	16	Skin (III ^c), eye (II ^c)	88 ^c	Severe	N	Pred, TAC, ECP, Campath	Y	N	117	Moderate	TAC, Pred
2	m	68	AML	Y	m	N	1	Skin (II ^c)	23	Skin (III ^c), GIT (II ^c)	315	Severe	N	Pred, MMF, ECP	N	Y	759	None ^d	MMF, Pred
3	m	57	MM	Y	f	Y	1	None		Skin (III ^c), fascia (II ^c), lung (II ^c), eye (I ^c), liver (I ^c), oral (I ^c)	365	Severe	Y	Pred, MMF, CsA, Imatinib, ECP	N	Y	571	Severe	CsA, MMF, Pred, Imatinib
4	m	55	CML	N	m	N	1	Skin (II ^c)	10	Skin (II ^c), GIT (II ^c)	253	Moderate	N	Pred, CsA, MMF	N	Y	3237	None ^d	None
5	m	51	HL	Y	m	Y	1	None		Skin (III ^c), GIT (II ^c), fascia (II ^c)	1078	Severe	Y	Pred, MMF, Everolimus, ECP, Ruxitinab	N	Y	2483	Severe	Everolimus, MMF, Pred
6	m	60	MM	Y	m	N	1	Skin (II ^c)	11	Lung (III ^c), eye (II ^c), oral (I ^c)	446	Severe	N	Pred, MMF	N	Y	1734	Severe	Pred
7	m	61	MM	Y	f	Y	1	Skin (II ^c)	25	Skin (III ^c), GIT (II ^c)	368	Severe	N	ECP, Pred, MMF, CsA	N	Y	715	Moderate ^e	Pred, MMF
8	m	67	MDS/AML	Y	m	N	1	GIT (II ^c)	50	Lung (II ^c), eye (II ^c), oral (I ^c)	302	Severe	N	Pred, MMF, Everolimus	N	Y	665	Severe	Pred, MMF, Everolimus
9	m	52	ALL	Y	m	N	1	Skin, GIT (III ^c)	114	Skin (III ^c)	351	Severe	Y	Pred, Everolimus, MMF	N	Y	1066	Moderate	MMF, Pred
10	m	45	AML	Y	m	N	1	None		Skin (II ^c), fascia (II ^c), polyserositis (III ^c), eye (II ^c), oral (I ^c)	264	Severe	Y	Pred, ECP, TAC, Everolimus, Imatinib, Etanercept	Y	Y	770	Severe	MMF, Pred, Everolimus, Etanercept
11	m	29	ALL	Y	m	N	1	Skin (I ^c)	21	None			N		N	Y	83	Mild	Pred, CsA
12	m	48	MDS/AML	Y	m	N	1	Skin (I ^c)	20	Skin (II ^c)	248	Moderate	N	TAC, Pred	Y	Y	91	Mild	TAC
13	m	60	MDS-RA	Y	m	Y	1	Skin (I ^c)	62	Skin (III ^c), oral (I ^c), liver (I ^c)	160	Severe	N	Pred, MMF, Ruxitinab, ECP	Y	Y	544	Severe ^e	MMF, Pred, ECP
14	m	23	AML	Y	f	Y	1	Skin, liver, GIT (III ^c)	110	Skin (III ^c), lung (III ^c), upper GIT (II ^c), eye (II ^c)	270	Severe	Y	MMF, TAC, CsA, Ruxitinab, Imatinib, ECP, Sirolimus, PUVA	Y	Y	2165	Severe	Pred, Imatinib, MMF
15	m	51	INHL	N	m	N	1	Skin (III ^c)	14	None			N		Y	Y	156	Severe	Pred
16	m	41	AML	Y	m,m,f	N	3	None		Lung (III ^c), liver (II ^c), eye (II ^c), oral (I ^c), fascia (I ^c)	270	Severe	N	Pred, CsA, MMF, Everolimus	N	Y	1410	Severe	Pred, MMF
17	f	40	MDS/AML	N	m	N	1	Skin (I ^c)	11	None			N		N	Y	128	Moderate ^e	CsA
18	f	30	HL	Y	m	Y	1	Skin (I ^c)	20	Lung (III ^c)	469	Severe	N	Pred, CsA, TAC, Everolimus, ECP, MMF, Imatinib	Y	Y	911	Severe	TAC, MFM, Pred
19	m	66	MDS/AML	N	m	N	1	Skin (II ^c)	10	None			N		Y	Y	34	Moderate	TAC, MFM, Pred
20	m	48	AML	Y	m	N	1	Skin, GIT (II ^c)	15	None			N		Y	Y	55	Moderate	TAC, Pred
21	m	58	MM	Y	m,m	Y	2	None		Skin (III ^c)	938	Severe	Y	None (localized scleroderma)	N	Y	1058	Mild	Pred
22	m	48	AML	Y	m	Y	1	Skin (I ^c)	20	Eye (III ^c), oral (I ^c), lung (I ^c)	196	Severe	N	Pred	N	Y	304	Moderate	Pred
23	m	58	TCL	Y	f	Y	1	Skin (II ^c)	36	Skin (II ^c), eye (I ^c), oral (I ^c)	173	Moderate	N	Pred, CsA, MMF	N	Y	2637	None ^d	None
24	m	52	AML	N	m	N	1	None		Skin (II ^c)	180	Moderate	N	TAC, Pred	Y	Y	195	Moderate	TAC, Pred
25	m	84	AML	Y	m	N	1	GIT (III ^c)	220	Skin (III ^c), eye (II ^c)	434	Severe	N	Pred, MMF	Y	Y	872	Mild	Pred, MMF
26	m	37	TCL	Y	f	Y	1	None		Skin (III ^c), eye (II ^c), genital (I ^c), fascia (II ^c), oral (I ^c), lung (I ^c)	258	Severe	Y	Pred, TAC, Everolimus, ECP, MMF	Y	Y	1122	Severe	TAC, Pred, MTX
27	m	69	MDS/AML	Y	m	N	1	Skin (I ^c)	34	None			N		Y	Y	51	Moderate ^e	TAC, Pred, MTX

aGVHD = acute graft-versus-host disease; ALL = acute lymphoblastic leukaemia; allo-HSCT = allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; AML = acute myeloid leukaemia; cGVHD = chronic graft-versus-host disease; CML = chronic myeloid leukaemia; CLL = chronic lymphoblastic leukaemia; CsA = Cyclosporine A; ECP = extracorporeal photopheresis; f = female; fNHL = follicular non-Hodgkin lymphoma; GIT = gastrointestinal tract; HL = Hodgkin lymphoma; HLA = human leukocyte antigen; m = male; MDS/AML = acute myeloid leukaemia evolving from myelodysplastic syndrome; MDS-RA = MDS with refractory anaemia; MFM = mycophenolate mofetil; MM = multiple myeloma; N = no; NA = not available; Pred = prednisolone; PUVA = psoralen and ultraviolet A; TAC = Tacrolimus; TCL = T-cell-lymphoma; Y = yes.

^a relative to allo-HSCT (days)

^b at date of first neurological examination

^c progressive onset

^d clinical symptoms of GVHD resolved, but muscle cramps initially occurring during GVHD persisted

^e if GBS/polynuropathy are considered as a manifestations of GVHD: all other manifestations were in complete remission

Table S2: Peripheral nervous system complications

Pat. #	Sex	Age (yrs)	Clinical and/or Electrodiagnostic Signs of			Features of Muscle Cramps						Therapy (Response Yes/No)
			PNP	Myositis or Myopathy	Muscle Cramps	allo-HSCT to Onset	Frequency	Duration	Intensity (VAS)	Localisation	Functional Disability	
1	m	52	Y	N	N	12 months	NA	NA	NA	GM + other muscles	N	Mg (Y)
2	m	68	Y	NA	Y	16 months	> once a day	1-10 min	NA	GM + other muscles	Y	Quinine (Y)
3	m	57	Y	Y	Y	<1 month	weekly	1-10 min	6	GM + other muscles	Y	Mg (Y)
4	m	55	Y	NA	Y	59 months	> once a day	1-10 min	NA	GM + other muscles	Y	Mg (N); Quinine (N)
5	m	51	Y	N	Y	NA	daily	NA	NA	GM + other muscles	Y	Mg (N); GBP (N)
6	m	60	Y	NA	Y	NA	monthly	NA	6	GM + other muscles	N	No therapy yet
7	m	61	Y	NA	Y	23 months	> once a day	> 10 min	9	GM + other muscles	Y	Mg (Y); Quinine (Y)
8	m	67	N	N	Y	27 months	> once a day	NA	4	GM + other muscles	Y	Mg (Y)
9	m	52	Y	N	Y	NA	> once a day	1-10 min	5	GM + other muscles	Y	Mg (N); Quinine (Y)
10	m	45	Y	N	N	<1 month	> once a day	1-10 min	9	GM only	Y	Mg (N); Quinine (N)
11	m	29	Y ^a	N	Y	1 month	> once a day	1-10 min	7	GM + other muscles	N	No therapy yet
12	m	48	N	N	Y	28 months	rare	NA	NA	GM only	N	Mg (Y)
13	m	60	Y	N	N	NA	daily	> 10 min	9	GM + other muscles	Y	Mg (Y); GBP (N); PGB (Y)
14	m	23	N	Y	Y	NA	daily	10-60 sec	7	GM + other muscles	N	No therapy yet
15	m	51	Y ^a	NA	Y	NA	rare	NA	NA	GM only	N	Mg (Y)
16	m	41	Y	Y	Y	NA	daily	> 10 min	9	GM + other muscles	Y	Mg (Y); GBP (N); PGB (Y)
17	f	40	Y ^a	N	N	NA						
18	f	30	Y	N	N	NA						
19	m	66	Y ^b	N	N	NA						
20	m	48	Y	NA	N	NA						
21	m	58	N	Y	Y	NA	> once a day	1-10 min	NA	GM + other muscles	N	Mg (Y); Quinine (N)
22	m	48	Y	N	Y	9 months	rare	> 10 min	NA	GM + other muscles	N	Mg (Y); GBP (Y)
23	m	58	Y	NA	Y	1 month	weekly	1-10 min	7	GM + other muscles	Y	Mg (Y); PGB (N); CBZ (N)
24	m	52	Y	NA	Y	6 months	> once a day	1-10 min	8	GM only	Y	Mg (N)
25	m	64	Y	N	N	NA						
26	m	37	Y	N	Y	6 months	> once a day	1-10 min	7	GM + other muscles	Y	Mg (Y); Quinine (N)
27	m	69	Y ^c	N	N	NA						

allo-HSCT = allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; CBZ = carbamazepine; f = female; GBP = gabapentin; GM = gastrocnemius muscle; m = male; Mg = magnesium salts; min = minutes; N = no; NA = not available; PGB = pregabalin; PNP = polyneuropathy; sec = seconds; VAS = visual analogue scale (0-10); Y = yes.

^a clinically and neurophysiologically axonal GBS

^b clinically GBS (primarily demyelinating, however electrodiagnostic criteria for demyelinating GBS not met)

^c clinically GBS with autonomic failure (primarily demyelinating, however electrodiagnostic criteria for demyelinating GBS not met)

Table S3: Anti-neuronal antibodies

Pat. #	Peripheral nerve ^a	Cerebellum ^b	Intestine ^c	Hu	Ri	Yo	Ma/Ta	CV2	GAD	Amphiphysin	NMDA-R	AMPA-R1	AMPA-R2	GABA _B R1	LG1	CASPR2	NMO-IgG
1	neg.	neg.	neg.														
2	neg.	neg.	neg.														
5	neg.	neg.	neg.														
8	neg.	neg.	neg.														
11	neg.	neg.	neg.														
12	neg.	ANA	neg.														
13	myelin	ANA	neg.														
15	neg.	AMA	neg.														
16	neg.	ANA	ANA	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
17	neg.	neg.	neg.														
19	neg.	neg.	neg.														
20	neg.	neg.	neg.														
22	neg.	neg.	neg.														
24	myelin	neg.	neg.														
26	neg.	ANA	ANA														
27	neg.	neg.	neg.														

AMA = antimitochondrial antibodies; AMPA-R = amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor; ANA = antinuclear antibodies; CASPR2 = contactin-associated protein-2; GABA_BR1 = gamma-aminobutyric acid type B1 receptor; GAD = glutamic acid decarboxylase; LG1 = leucine-rich glioma inactivated 1 protein; neg. = negative; NMDA-R = N-methyl-D-aspartate receptor.

^a 1:320 dilution of serum

^b 1:10 dilution of serum

^c 1:10 dilution of serum; plexus myentericus

3. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Jun. Prof. Dr. med. Ingo Kleiter und Herrn PD Dr. med. Klemens Angstwurm für die außerordentlich engagierte Betreuung dieser Arbeit und die überaus herzliche Aufnahme in die neuroimmunologische Arbeitsgruppe. Durch die intensive, weit über die Publikation hinausreichende Zusammenarbeit, durfte ich Herangehensweisen an Herausforderungen und Probleme von Ihnen erlernen, welche mir in meinem zukünftigen Berufsleben stets hilfreich sein werden.

Von ganzem Herzen möchte ich auch meinen lieben Eltern danken, welche mir mein Studium und die Promotion ermöglicht haben und mir bei meinen Vorhaben, ebenso wie meine Partnerin Sara Schnur, stets unterstützend und motivierend zur Seite gestanden haben.

4. Erklärungen

Die Dissertation wurde von Jun. Prof. Dr. med. Ingo Kleiter (mittlerweile Universität Bochum) und PD. Dr. med. Klemens Angstwurm angeregt und in ihrer Ausführung überwacht.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir mittelbar oder unmittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum

Unterschrift